

# Haarnadelförmige PNA-Peptid-Konjugate Responsive Architekturen für die Untersuchung von Proteinen und Proteaseaktivitäten

DISSERTATION

zur Erlangung der akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)  
im Fach Chemie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Dipl.-Chem. Melanie Fischbach

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät:  
Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

1. Prof. Dr. Oliver Seitz
2. Prof. Dr. Christian Hackenberger

Tag der Einreichung: 24. März 2015

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Juni 2015



# Zusammenfassung

Das Entwicklungsstadium bestimmter Krankheiten ist eng mit der Konzentration diverser Proteine in biologischen Proben verknüpft. Eine sensitive Detektion dieser sogenannten Biomarker kann somit maßgeblich zu einer frühzeitigen Diagnose beitragen. In der vorliegenden Arbeit wurden strukturierte, fluorogene Sonden entwickelt, die die Möglichkeit bieten in einem homogenen Verfahren Zielproteine sensitiv, direkt und in Echtzeit nachzuweisen.

Die peptidische Erkennungssequenz für das Zielprotein wurde dabei von zwei zueinander komplementären PNA-Segmenten flankiert. Die Sonden besaßen dadurch eine haarnadelförmige Anordnung, in der kontrolliert eingebaute Reporter in eine enge Proximität gezwungen wurden und ein minimales Hintergrundsignal im ungebundenen Zustand gewährleisten. Durch die Wechselwirkung mit dem Zielprotein erfolgte eine Reorganisation der Sondenstruktur, die fluoreszenzspektroskopisch verfolgt werden konnte. Für den Einbau der fluorogenen Einheiten wurden verschiedene Strategien entwickelt und die resultierenden Architekturen bzgl. ihres Einsatzes als sensitives Detektionssystem validiert. Als Zielproteine wurden dabei die intrazellulären SH2-Domänen der Src- und Lck-Kinase sowie die extrazelluläre Matrix-Metalloprotease MMP-7, ein proteolytischer Biomarker für Krebs, untersucht. Besonders die neuartigen *In-Stem Hairpin Peptide Beacons (IS-HPBs)*, bei denen fluorogene Pseudonukleobasen in die PNA-Stammregion eingebaut wurden, zeichneten sich als sensitive Proteasereporter mit einer bis zu 50-fachen Signalverstärkung aus. Mit einem excimerbasierten *IS-HPB* und einer zeitaufgelösten Fluoreszenzmethode konnte die direkte Detektion von MMP-7 bei einer kritischen Konzentration von 1 nM im humanen Blutserum erreicht werden. Eine mögliche Anwendbarkeit in der medizinischen Diagnostik wurde somit bekräftigt. Weiterhin wurden erste Hinweise mithilfe thermodynamischer Untersuchungen erhalten, dass die Strukturierung einer peptidischen Sonde zu einer erhöhten Selektivität beiträgt.

Schlagworte: Peptidnukleinsäure, Proteindetektion, Biomarker, Fluoreszenz, Excimer





# Abstract

The developmental stage of certain diseases is closely linked to the concentration of various proteins in biological samples. A sensitive detection of these so-called biomarkers can thus significantly contribute to an early diagnosis. In the present work, structured, fluorogenic probes were developed that offer the possibility of a sensitive, direct and in real-time detection of target proteins in a homogeneous process.

The peptidic recognition sequence for the target protein was thereby flanked by two self-complementary PNA segments. As a result, the probes possessed a hairpin-type arrangement, in which suitable appended labels are forced into close proximity and guaranteed a minimal background signal in the unbound state. By interacting with the target protein a reorganization of the probe structure occurred, which could be followed by fluorescence spectroscopy. To embed the fluorogenic units different approaches were developed and the resulting architectures were validated relating to their use as a sensitive detection system. As target proteins the intracellular SH2-domains of the Src and Lck kinase and the extracellular matrix metalloprotease MMP-7, a proteolytic biomarker for cancer, were investigated. In particular, the new In-Stem Hairpin Peptide Beacons (IS-HPBs), in which fluorogenic pseudo nucleic acids were incorporated into the PNA-stem region, proved as sensitive protease reporters with an up to 50-fold signal amplification. By using an excimer-signaling IS-HPB and a time-resolved fluorescence method the direct detection of MMP-7 with a critical concentration of 1 nM within complex human blood serum was achieved. A possible application in medical diagnostics was thus confirmed. Furthermore, initial indications were obtained using thermodynamic studies that the structure of a peptide-based probe contributes to increased selectivity.

keywords: peptide nucleic acid, protein detection, biomarker, fluorescence, excimer

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Oliver Seitz am Institut für Chemie der Humboldt Universität zu Berlin im Fachgebiet der Organischen und Bioorganischen Synthese in der Zeit vom Januar 2010 bis Juli 2014 durchgeführt.

*„Wenn dir alles gelingt, was du versuchst,  
dann versuchst du nicht genug.“*

Gordon Moore



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Stand der Forschung</b>	<b>3</b>
2.1	Die SH2-Domäne - Ein intrazelluläres Interaktionsmodul . . . . .	3
2.2	Die Matrix-Metalloproteasen & ihre Rolle als extrazellulärer Biomarker	7
2.3	Peptidbasierte Konzepte für die Untersuchung von Proteinen und Proteaseaktivitäten . . . . .	9
2.3.1	Fluoreszenzbasierte Systeme . . . . .	9
2.3.2	Signalamplifizierung über Mehrfachpräsentation . . . . .	19
2.3.3	Elektrochemische Systeme . . . . .	22
2.4	PNA als multifunktionales Werkzeug . . . . .	22
2.4.1	Templatvermittelte Generierung von bioaktiven Peptiden . . .	24
2.4.2	Hybridisierungsbasierte Kontrolle der Peptidkonformation . .	25
2.4.3	PNA-Peptid-Konjugate in der Proteindetektion . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>33</b>
4.1	Strategien und Optimierung der PNA-Peptid-Konjugatsynthese . . .	33
4.1.1	Synthese unmarkierter PNA-Peptid-Konjugate . . . . .	34
4.1.2	Synthese von FAM/Dabcyl-markierten PNA-Peptid-Konjugaten	37
4.1.3	Synthese von modifizierten PNA-Monomeren . . . . .	39
4.1.4	Synthese der PNA-Peptid-Konjugate mit stamminterner Fluo- reszenzmarkierung . . . . .	41
4.2	Charakterisierung der Stabilität des intramolekularen Duplexes der PNA-Peptid-Konjugate . . . . .	47
4.2.1	Unmarkierte & FAM/Dabcyl-markierte PNA-Peptid-Konjugate	47
4.2.2	PNA-Peptid-Konjugate mit stamminterner Markierung . . . .	49
4.3	Expression und Isolierung der Src und Lck SH2-Domäne . . . . .	52

4.4	Erhöhung der Responsivität durch alternative Markierung der PNA-Peptid-Konjugate . . . . .	55
4.4.1	Sequenzinterne Fluoreszenzmarkierung . . . . .	56
4.4.2	Konzept der stamminernen Fluoreszenzmarkierung . . . . .	59
4.4.3	Optimierung der fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der <i>IS-HPBs</i> . . . . .	60
4.4.4	Detektion von SH2-Proteindomänen mit <i>IS-HPBs</i> . . . . .	63
4.4.5	Detektion der Matrix-Metalloprotease 7 mit <i>IS-HPBs</i> . . . . .	71
4.5	Thermodynamische Untersuchung der PNA-Peptid-Konjugate . . . . .	83
4.5.1	ITC-Messungen mit GST-Lck SH2 . . . . .	87
4.5.2	ITC-Messungen mit GST-Src SH2 . . . . .	89
4.5.3	ITC-Messungen bei verschiedenen Temperaturen . . . . .	91
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>95</b>
5.1	Zusammenfassung . . . . .	95
5.2	Ausblick . . . . .	101
<b>6</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>103</b>
6.1	Messgeräte und Hilfsmittel . . . . .	103
6.1.1	Chromatographische Methoden . . . . .	104
6.1.2	Spektroskopische Methoden . . . . .	105
6.2	Allgemeine Synthesevorschriften . . . . .	109
6.2.1	Polymere Trägermaterialien . . . . .	109
6.2.2	Manuelle Festphasensynthese . . . . .	110
6.2.3	Automatisierte Festphasensynthese . . . . .	113
6.2.4	Isolierung und Reinigung der Endprodukte . . . . .	114
6.3	Molekularbiologische Arbeit . . . . .	115
6.4	Bestimmung von $K_D$ -Werten mittels Fluoreszenzanisotropie . . . . .	119
6.5	Versuche zur sequenzinternen Fluoreszenzmarkierung . . . . .	120
6.6	Versuche zur stamminernen Fluoreszenzmarkierung . . . . .	121
6.6.1	Synthese der modifizierten PNA-Monomere . . . . .	121
6.6.2	Detektion von SH2-Proteindomänen mit <i>IS-HPBs</i> . . . . .	126
6.6.3	Detektion der Matrix-Metalloprotease 7 mit <i>IS-HPBs</i> . . . . .	133
6.7	Versuche zur thermodynamischen Untersuchung der PNA-Peptid-Konjugate . . . . .	138
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>147</b>

<b>A</b>	<b>Analytik der synthetisierten Verbindungen</b>	<b>161</b>
A.1	Chromatogramme und Massenspektren . . . . .	161
A.1.1	Verbindungen aus Kapitel 4.4.1 . . . . .	161
A.1.2	Modifizierte PNA-Monomere . . . . .	162
A.1.3	Verbindungen aus Kapitel 4.4.4 . . . . .	163
A.1.4	Verbindungen aus Kapitel 4.4.5 . . . . .	171
A.1.5	Verbindungen aus Kapitel 4.5 . . . . .	175
A.2	NMR-Spektren . . . . .	183
<b>B</b>	<b>Übersicht der verwendeten Verbindungen</b>	<b>187</b>
<b>C</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>189</b>

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Regulierung der Lck-Kinaseaktivität. . . . .	4
2.2	Kristallstrukturen einer Auswahl von SH2-Domänen. . . . .	5
2.3	Strukturelle Gruppierung einer Auswahl an MMPs. . . . .	7
2.4	Kristallstrukturen der katalytischen Domäne einer Auswahl an MMPs. .	8
2.5	Potentiell Interaktionsmuster zwischen ErbB3-Rezeptor und diversen SH2-Domänen. . . . .	10
2.6	Konzept eines auf Fluoreszenzpolarisation basierenden Assays für die Untersuchung von Proteasen. . . . .	11
2.7	Konzept der umgebungssensitiven Sonden. . . . .	11
2.8	Struktur und Nomenklatur einiger solvatochromer Fluorophore bzw. deren Aminosäure. . . . .	12
2.9	Detektion von $\text{Ca}^{2+}$ -aktiviertem Calmodulin. . . . .	13
2.10	Konzept von dualmarkierten Fluoreszenzsonden. . . . .	13
2.11	Detektion eines Antikörpers mit einer excimerbasierten Peptidsonde. . .	15
2.12	Detektion eines Antikörpers mit einer dualmarkierten Peptidsonde un- ter Verwendung von fluoreszenten Proteinen. . . . .	17
2.13	Detektion eines Antikörpers mit einer dualmarkierten Peptidsonde un- ter Anwendung des photoinduzierten Elektronenverkehrs. . . . .	17
2.14	Detektion von Proteasen mit Thioamid-modifizierten Peptidsonden. . .	18
2.15	Detektion einer Protease mit einer strukturierten Peptidsonde. . . . .	19
2.16	Detektion einer Protease mit QD und AuNP. . . . .	20
2.17	Untersuchung von Proteaseaktivitäten mithilfe funktionalisierter AuNP.	21
2.18	Untersuchungen von Protein-Peptid-Interaktionen mit Ferrocen-konju- gierten Peptidsonden. . . . .	22
2.19	Vergleich der chemischen Grundstruktur von Peptiden, PNA und DNA.	23
2.20	Templatvermittelte Generierung eines bioaktiven Peptids. . . . .	24
2.21	RNA-vermittelter Peptidyltransfer unter Bildung eines zelltoxischen PNA- Peptid-Konjugats. . . . .	25



---

2.22	Regulierung der Src-Kinaseaktivität durch hybridisierungsbasierte Steuerung der Peptidkonformation. . . . .	26
2.23	Konzept der Quantifizierung von Antikörpern mithilfe von PNA-Peptid-Konjugaten. . . . .	27
2.24	Strukturformen, Funktionsweise und Anwendungsbeispiele von PNA-Peptid-Konjugaten in der Proteindetektion. . . . .	27
3.1	Detektionsprinzip von haarnadelstrukturierten, dualmarkierten PNA-Peptid-Konjugaten. . . . .	29
3.2	Detektionsprinzip der (a) terminal, (b) sequenzintern und (c) stammin-tern markierten, haarnadelförmigen PNA-Peptid-Konjugate. . . . .	30
4.1	Allgemeine Methodik zur Herstellung von PNA-Peptid-Konjugaten. . .	33
4.2	HPLC-Spuren der Rohprodukte von <b>13</b> mit und ohne terminale Fmoc-Schutzgruppe. . . . .	34
4.3	Synthese unmarkierter PNA-Peptid-Konjugate. . . . .	35
4.4	Synthese der FAM/Dabcyl-markierten PNA-Peptid-Konjugate mit terminaler und sequenzinterner Markierung. . . . .	38
4.5	Synthese der modifizierten PNA-Monomere für die Festphasensynthese.	40
4.6	Syntheschema von <i>IS-HPBs</i> . . . . .	42
4.7	Strukturen der PNA-Monomere in den <i>IS-HPBs</i> . . . . .	43
4.8	HPLC-Spuren verschiedener Kupplungsmethoden für Pyrenbuttersäure.	45
4.9	HPLC-Spuren verschiedener Abspaltbedingungen. . . . .	46
4.10	Struktur des geschützten Phosphotyrosin-Bausteins und HPLC-Spuren verschiedener Methoden zur Abspaltung der Schutzgruppe. . . . .	46
4.11	Nachweis der intramolekularen Hybridisierung mittels thermischer Denaturierungsexperimente. . . . .	48
4.12	Variation der Haarnadelstabilität und Auswirkungen auf die Schmelztemperatur der PNA-Peptid-Konjugate. . . . .	48
4.13	Thermische Denaturierung eines unstrukturierten und strukturierten PNA-Peptid-Konjugats. . . . .	51
4.14	SDS-PAGE der gereinigten Fusionsproteine. . . . .	53
4.15	Bestimmung der $K_D$ -Werte des Referenzpeptids FAM-GpYEEIA-NH <sub>2</sub> mit diversen, isolierten SH2-Domänen mittels Fluoreszenzanisotropie. .	54
4.16	Funktionsprinzip von <i>HPBs</i> mit terminaler Fluoreszenzmarkierung. . .	55
4.17	Funktionsprinzip von <i>HPBs</i> mit sequenzinterner Fluoreszenzmarkierung.	56

4.18	Vergleich der fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der verschiedenen Sondentypen. . . . .	58
4.19	Funktionsprinzip der <i>IS-HPBs</i> bei der Bindung an ein Zielmolekül am Beispiel eines excimerbasierten <i>IS-HPBs</i> . . . . .	59
4.20	Hintergrundfluoreszenzen & Schmelztemperaturen einiger monomer- und excimerbasierten <i>IS-HPBs</i> . . . . .	61
4.21	Nachweis der Notwendigkeit des Quencher-moleküls. . . . .	62
4.22	Einfluss der zum Fluorophor benachbarten PNA-Monomere auf die Emission. . . . .	63
4.23	Detektion der Src SH2-Domäne. . . . .	64
4.24	Signalanstiege bei der Detektion von SH2-Domänen. . . . .	64
4.25	Korrelation der Signalanstiege & $K_D$ -Werte mit Src SH2 mit der Schmelztemperatur einer Auswahl an monomerbasierten <i>IS-HPBs</i> . . . . .	65
4.26	Bindungsisothermen und resultierende $K_D$ -Werte einiger monomer- und excimerbasierter <i>IS-HPBs</i> . . . . .	66
4.27	Konzept der enzymatischen Spaltungsexperimente zur Feststellung der maximalen Fluoreszenzanstiege. . . . .	68
4.28	Enzymatische Spaltung bei Behandlung mit CIP. . . . .	69
4.29	Detektion verschiedener MMP-7-Konzentrationen im Puffer. . . . .	72
4.30	Korrelation der Signalanstiege mit 25 nM MMP-7 nach 24 h Inkubation, der Hintergrundsignale mit der Schmelztemperatur der <i>IS-HPBs</i> . . . . .	73
4.31	Reduktion des Hintergrundsignals und Erhöhung der Responsivität von MMP-7-spezifischen <i>IS-HPBs</i> . . . . .	74
4.32	Untersuchung einer Probenlösung nach der Inkubation mit MMP-7. . . . .	75
4.33	Detektion von 25 nM MMP-7 in Puffer. . . . .	76
4.34	Statische Fluoreszenzmessung in Puffer und DMEM*. . . . .	77
4.35	TCSPC-Histogramme nach 24 h Inkubation mit MMP-7. . . . .	78
4.36	Detektion von MMP-7 im unverdünnten Humanserum. . . . .	80
4.37	Optimierte Detektion von MMP-7 im Humanserum. . . . .	81
4.38	Detektion von 1 nM MMP-7 im Humanserum. . . . .	82
4.39	Hybridisierungsexperimente von Bonnet <i>et al.</i> mit einem <i>MB</i> und einem unstrukturierten Oligonukleotid. . . . .	84
4.40	ITC-Experiment mit optimierten Bedingungen. . . . .	87
4.41	Korrigierte Bindungsisotherme der Titration von Peptid <b>33</b> in GST-Src SH2. . . . .	90
4.42	Temperaturabhängige Auftragung der thermodynamischen Parameter. . . . .	92

4.43	Diagramm des Entropie- und Entropieterms der freien Enthalpie. . . . .	93
4.44	Temperaturabhängigkeit von $\Delta G$ . . . . .	94
5.1	Allgemeiner Aufbau der untersuchten haarnadelförmigen PNA-Peptid-Konjugate. . . . .	95
5.2	Anstieg der Donoremission infolge der Wechselwirkung mit dem Zielmolekül am Beispiel des excimerbasierten <i>IS-HPBs</i> . . . . .	96
5.3	Allgemeiner Aufbau der <i>IS-HPBs</i> und Struktur des <i>Spacers</i> ( <b>40</b> ). . . . .	97
5.4	Eigenschaften einer Auswahl an SH2-spezifischen Sonden. . . . .	98
5.5	Auswahl an Ergebnissen der MMP-7-Detektion in Puffer. . . . .	99
5.6	TCSPC-Histogramme der MMP-7-Detektion in komplexen, biologischen Medien. . . . .	100
6.1	Elutionsprofil einer FPLC-Aufreinigung am Beispiel von GST-Src SH2. . . . .	118
6.2	Erste ITC-Experimente mit GST-Src SH2. . . . .	146

# Tabellenverzeichnis

2.1	$K_D$ -Werte der Bindung von Src SH2-Domänen mit diversen Peptidsequenzen. . . . .	6
2.2	Beispiele von Löschmechanismen dualmarkierter Fluoreszenzsonden. . .	14
4.1	Verwendete Peptidsequenzen mit Zielproteinen und Anwendungsgebieten.	33
4.2	Übersicht der unmarkierten PNA-Peptid-Konjugate mit pYEEI-Motiv.	35
4.3	Übersicht der unmarkierten PNA-Peptid-Konjugate mit pYPQPQ-Motiv.	36
4.4	Übersicht der unmarkierten PNA-Peptid-Konjugate mit pYEEI-Motiv und nur einem PNA-Segment. . . . .	37
4.5	Übersicht der hergestellten, unmarkierten Peptide. . . . .	37
4.6	Übersicht der Sonden zur Evaluation der sequenzinternen Markierung. .	38
4.7	Übersicht der PNA-Peptid-Konjugate mit stamminterner Fluoreszenzmarkierung und Peptidsonden. . . . .	43
4.8	Übersicht der Schmelztemperaturen der unmarkierten und FAM/Dabcyl-markierten PNA-Peptid-Konjugate. . . . .	49
4.9	Schmelztemperaturen einer Auswahl an SH2-spezifischen PNA-Peptid-Konjugaten. . . . .	50
4.10	Übersicht der Schmelztemperaturen der MMP-7-spezifischen <i>IS-HPBs</i> . .	52
4.11	Verwendete Erkennungssequenzen und deren Zielproteine. . . . .	60
4.12	Relative Bindungsaffinitäten der PNA-Peptid-Konjugate für die SH2-Domänen. . . . .	84
4.13	Relative Bindungsaffinitäten der Phosphopeptide für die SH2-Domänen.	86
4.14	Thermodynamische Parameter der Messungen von GST-Lck SH2. . . .	88
4.15	Thermodynamische Parameter der Messungen von GST-Src SH2. . . .	90
4.16	Übersicht der freien Bindungsenthalpieänderungen. . . . .	91
6.2	Zusammensetzung der denaturierenden Gelpräparationen. . . . .	118
6.3	Verwendete Parameter der verschiedenen ITC-Experimente. . . . .	144

# 1 Einleitung

Die strukturelle und funktionale Aufklärung der Gesamtheit aller Proteine einer Zelle sind Ziele des Fachgebiets der Proteomik. Proteine und deren Funktion bestimmen maßgeblich die phänotypische Vielfalt, die aus gleichen Genen entsteht. Posttranslationale Modifikationen tragen dabei zu deren Struktur, Funktion, Lokalisierung und Reifung bei. Im Gegensatz zur Stabilität des Genoms, ist das Proteom ein hochdynamisches System, das ständigen Änderungen der Konzentration und Zusammensetzung unterliegt. Fehlregulierungen können zur Entstehung diverser Krankheiten beitragen und für die medizinischen Diagnostik verwendet werden.<sup>[1,2]</sup> Die Identifikation und Untersuchung sogenannter Biomarker bildet dabei einen zentralen Forschungsschwerpunkt.<sup>[3,4]</sup> Diese Proteine oder Peptide bzw. deren Konzentrationen in komplexen, biologischen Medien, wie Serum, Plasma oder Urin, sind eng mit spezifischen Krankheiten oder deren Entwicklungsstadien verknüpft. Mithilfe der Bestimmung ihrer aktiven Population erlauben sie die frühzeitige Diagnose und Prognose von Krankheiten, wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen,<sup>[5]</sup> Krebs<sup>[6–11]</sup> und Alzheimer,<sup>[12]</sup> sowie die Bewertung des Therapieverlaufs bei der Behandlung mit diversen Wirkstoffen.

Mit der Verbesserung der Auflösung massenspektrometrischer Verfahren und der Kopplung mit chromatographischen und gelelektrophoretischen Techniken wurde die Entdeckung von potentiellen Biomarkern enorm voran getrieben.<sup>[13–15]</sup> Die Methoden für deren Quantifizierung basieren auf der Transformation der Wechselwirkung mit dem Zielmolekül in optische (Absorption oder Emission), elektrische (Leitfähigkeit) oder mechanische (Masse) Signale, die die vorhandene Konzentration proportional widerspiegeln.<sup>[16–18]</sup> Die häufigste Methodik in der klinischen Anwendung beruht zurzeit auf einem heterogenen, immunohistochemischen Verfahren, dem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA).<sup>[19–22]</sup> Diese Technik erfordert jedoch aufwändige Waschprozesse und ermöglicht keine direkte Untersuchung in Echtzeit. Des Weiteren ist eine vorherige Herstellung selektiver Antikörper notwendig. Erstrebenswert wäre eine simple Methode für die zuverlässige Detektion und Quantifizierung von Biomarkern in biologischen Medien ohne zusätzliche Arbeitsschritte

oder Komponenten. Eine Möglichkeit zur Realisierung bieten fluoreszenzmarkierte, peptidbasierte Sonden, die von dem Biomarker in homogener Lösung spezifisch erkannt und gebunden bzw. prozessiert werden. Die Entwicklung von haarnadelförmigen, dualmarkierten PNA-Peptid-Konjugaten mit einer niedrigen Hintergrundfluoreszenz erlaubte die sensitive Detektion einer SH2-Domäne mit einer 12-fachen Signalverstärkung.<sup>[23]</sup> Diese Ergebnisse liegen jedoch weit unter den bis zu dreistelligen Resultaten, die bei der Detektion von Nukleinsäuren mit DNA-basierten Sonden erreicht wurden.<sup>[24–26]</sup> Durch die Entwicklung eines alternativen Sondendesigns der peptidbasierten, haarnadelförmigen PNA-Peptid-Konjugate sollte eine Steigerung der Sensitivität möglich sein und somit deren Potential für eine Anwendung in der klinischen Diagnostik diverser Biomarker erhöhen.

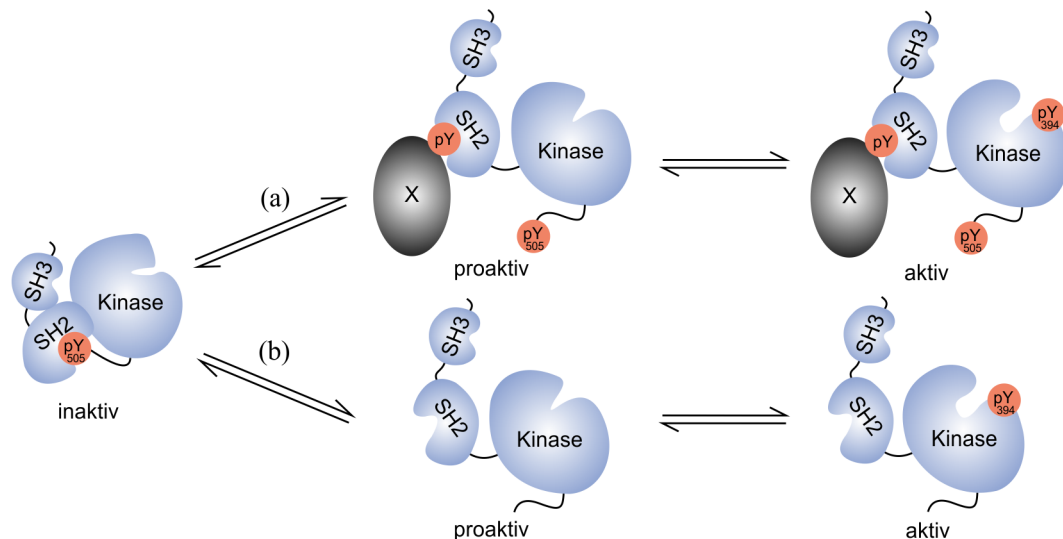
## 2 Stand der Forschung

### 2.1 Die SH2-Domäne - Ein intrazelluläres Interaktionsmodul

Die Familie der *Src Homology 2* (SH2)-Domänen ist eine der umfangreichsten Vertreter der Proteininteraktionsmodule. Sie erkennen spezifisch phosphorylierte Tyrosinreste (pY) und sind somit ein wichtiger Bestandteil der Proteinkinase-vermittelten Zellregulierung. Neben der Transduktion externer Signale durch die Wechselwirkung mit Zellrezeptoren sind die Domänen an der Kontrolle von intrazellulären Prozessen, wie der Zelldifferenzierung oder -proliferation, dem Proteinabbau oder -transport, der Genexpression und DNA-Reparatur, entscheidend beteiligt.<sup>[27]</sup> Im menschlichen Organismus konnten bisher 120 Domänen in 100 verschiedenen Proteinen identifiziert werden, von denen 10 tandem-SH2-Domänen besitzen. Anhand ihrer strukturellen Übereinstimmungen und der Zusammensetzung mit weiteren funktionalen Modulen können die zahlreichen Mitglieder in diverse Gruppen, wie Kinasen, Phosphatasen oder Transkriptionsfaktoren, eingeteilt werden.<sup>[28]</sup>

Bei der Wechselwirkung der SH2-Domäne mit ihrem Bindungspartner werden in der Regel nur kurze Peptidsequenzen spezifisch gebunden, die im physiologischen Kontext einem Abschnitt des interagierenden Proteins entsprechen. Allen gemein ist, dass für eine Bindung mit hoher Affinität ein Phosphotyrosin notwendig ist, dessen C-terminaler Sequenzkontext (pY+1 bis +5) zumeist die Bindung durch einen individuellen Vertreter bestimmt. Um falsche Signale durch fehlerhafte Assoziationen in der dichten, kompetitiven Umgebung der Zelle zu vermeiden, entwickelte sich evolutionär eine hohe Spezifität gegenüber den jeweiligen Erkennungssequenzen.<sup>[29]</sup> Die Entdeckung dieser Peptidsequenzen und Zuordnung zu den korrespondierenden Proteinen bildete einen zentralen Forschungsschwerpunkt, um das Verständnis des Interaktionsnetzwerks in der Zelle zu verbessern. Die Methoden basierten dabei vor allem auf der Verwendung von Peptidbibliotheken und einer affinitätsbasierten Separierung aus den Sequenzvariationen mithilfe immobilisierter Proteine.<sup>[30–32]</sup>

Neben der Identifizierung von Erkennungssequenzen lag ein weiterer Fokus auf der Aufklärung der Funktion der SH2-Domänen und deren Relevanz für die Entwicklung von Krankheitsbildern. Es konnten beispielsweise unter Verwendung von genetisch manipulierten Zelllinien Einblicke in die Funktion der SH2-Domäne der, vor allem in T-Zellen exprimierten, Lck-Kinase (engl. *lymphocyte specific*) gewonnen werden.<sup>[33]</sup> Es gelang der Nachweis, dass die Lck-Kinase maßgeblich an der T-Zell-vermittelten Immunantwort beteiligt ist. Dabei nimmt die Regulierung ihrer Kinaseaktivität mittels der SH2-Domäne eine zentrale Rolle ein. Wenn kein externer Stimulus vorliegt, ist das C-terminale Phosphotyrosin (pY505, im Sequenzkontext pYQPQ) mit der intramolekularen SH2-Domäne assoziiert und zwingt die katalytische Domäne in eine inaktive Konformation (Abbildung 2.1). Diese wird durch eine



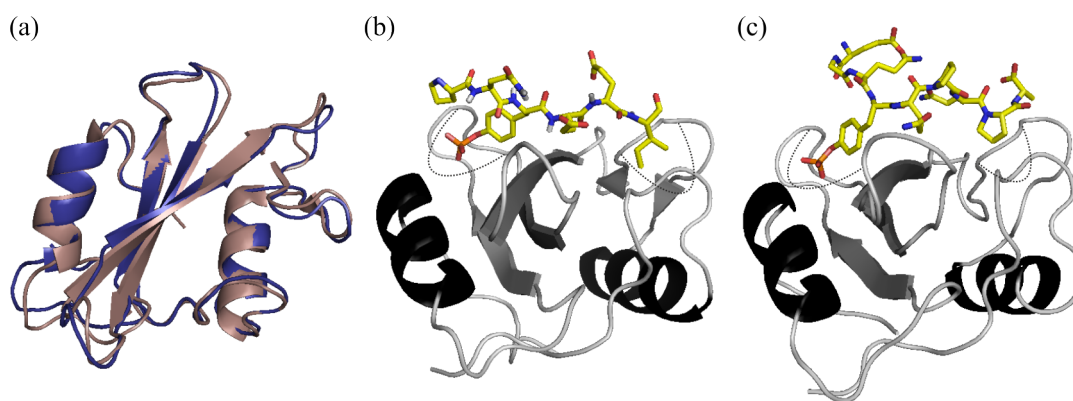
**Abbildung 2.1:** Regulierung der Lck-Kinaseaktivität. Aktivierung infolge der: (a) Verdrängung durch einen extrinsischen Liganden X. (b) Dephosphorylierung durch eine Phosphatase.<sup>[34]</sup>

Interaktion mit der SH3-Domäne zusätzlich stabilisiert. Infolge der Verdrängung durch einen extrinsischen Liganden (a) oder der Dephosphorylierung mittels einer Phosphatase (b) geht die Struktur in eine proaktive Form über, die durch die Autophosphorylierung an Position Y394 entsteht. Diese Form ist wiederum in der Lage die T-Zellrezeptoren zu aktivieren und somit eine Immunantwort einzuleiten.<sup>[34,35]</sup> Defekte in der Lck-Expression führen somit zu schwerwiegenden Missständen in der T-Zell-vermittelten Immunantwort.<sup>[36]</sup> Die Entwicklung von Krankheitsbildern infolge einer Fehlregulierung von SH2-vermittelten, zellulären Prozessen ist nicht auf die Lck SH2-Domäne beschränkt, sondern konnte für zahlreiche weitere Vertreter aufgedeckt werden.<sup>[28]</sup> So kann eine Mutation der zellulären Src-Kinase zur Onko-



genese führen.<sup>[37]</sup> Aufgrund dessen stellen die SH2-Domänen ein interessantes *Drug Target* in der Medikamentenentwicklung dar.<sup>[38–40]</sup>

Die Kristallstrukturen der Lck und Src SH2-Domäne verdeutlichen exemplarisch, dass sich die dreidimensionalen Strukturen der einzelnen Domänen, aufgrund der stark konservierten, in etwa 100 Aminosäuren langen Primärsequenz, sehr ähnlich sind (Abbildung 2.2 a). Sie bestehen im Wesentlichen aus zwei  $\alpha$ -Helizes ( $\alpha$ A,  $\alpha$ B) und zentralen antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta$ A- $\beta$ G), die über Schleifenregionen miteinander verknüpft sind. Durch die Kokristallisation mit Bindungspeptiden konnten die Wechselwirkungen beim Bindungsprozess näher charakterisiert und



**Abbildung 2.2:** Kristallstrukturen einer Auswahl von SH2-Domänen. (a) Vergleich der Lck SH2- (blau, PDB-ID: 1LCK) und Src SH2-Domäne (braun, PDB-ID: 1SPS). (b) Src SH2-Domäne mit dem Peptidsegment PQpYEEI aus dem *hamster polyoma-virus middle-sized tumor (hmT)*-Antigen (PDB-ID: 1SPS). (c) Lck SH2-Domäne mit dem Peptidsegment TEGQpYQPQPA aus dem C-Terminus der Lck-Kinase (PDB-ID: 1LCK). Die Vertiefungen sind durch eine gestrichelte Linie angedeutet.

zwei Vertiefungen, die essentiell für die Assoziation sind, identifiziert werden (Abbildung 2.2 b, c). Die erste wird durch Teile von  $\alpha$ A,  $\beta$ B und  $\beta$ D geformt und ist für die Koordination von pY über ein Zusammenspiel aus elektrostatischen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen verantwortlich. Dabei kommt dem stark konservierten Rest Arg $\beta$ B5 eine zentrale Rolle zu, dessen Verlust in Mutationsexperimenten einen nahezu vollständigen Rückgang der Bindungsaffinität nach sich zog (Tabelle 2.1).<sup>[41,42]</sup> In der zweiten Tasche erfolgt die Assoziation vorwiegend über hydrophobe Wechselwirkungen. Die Bindung einer Peptidsequenz an die SH2-Domäne findet zumeist in einer gestreckten Konformation statt, wobei nur für 4-7 Aminosäuren der direkte Kontakt mit der Domäne nachweisbar ist. Der Vergleich mit der freien Src SH2-Domäne deckte nur minima-

le konformative Änderungen während der Peptidbindung auf. So ist die hydrophile pY-Tasche der isolierten SH2-Domäne im unkomplexierten Zustand leicht nach außen geöffnet, wohingegen die hydrophobe Vertiefung etwas verschlossen ist.<sup>[43]</sup>

Um wichtige Positionen für eine starke Wechselwirkung mit der Src SH2-Domäne zu identifizieren, wurden die Aminosäuren eines Bindungsmotivs sukzessiv gegen Alanin ausgetauscht und die  $K_D$ -Werte der bimolekularen Assoziation mithilfe der Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) ermittelt (Tabelle 2.1).<sup>[44]</sup> Ein Vergleich

**Tabelle 2.1:**  $K_D$ -Werte der Bindung von Src SH2-Domänen mit diversen Peptidsequenzen.<sup>[44]</sup>

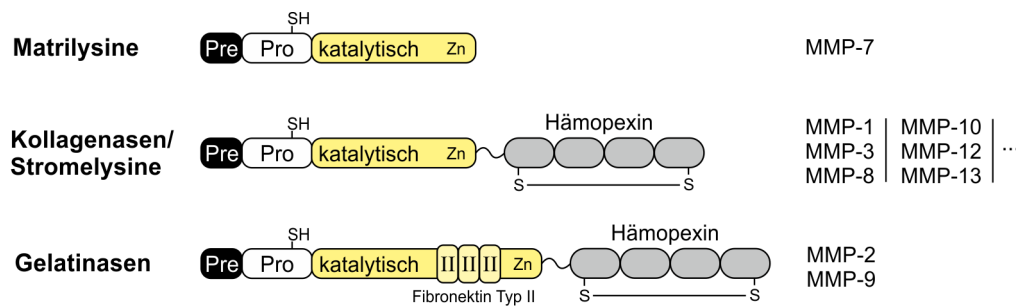
SH2-Mutant	Sequenz	$K_D$ [ $\mu$ M]
Wildtyp	PQpYEEIPI	0.18
	PQpYEEAPI	1.75
	PQpYAEIPI	0.34
	PQYEEIPI	2222
$\beta$ B5 (R $\rightarrow$ A)		39.4
$\beta$ D6 (K $\rightarrow$ A)	PQpYEEIPI	1.80
$\alpha$ A2 (R $\rightarrow$ A)		1.07

durch ITC-Messungen bei 25 °C ermittelt.

mit dem  $K_D$ -Wert der unveränderten Sequenz PQpYEEIPI offenbarte essentielle Positionen für eine Bindung mit hoher Affinität, die durch einen kleinen Wert der Dissoziationskonstante gekennzeichnet war. Weiterhin wurde die Vorstellung, dass für eine starke Assoziation maßgeblich zwei Bindungstaschen verantwortlich sind, durch die Resultate unterstützt. Der Austausch des Isoleucins an Position pY+3 gegen Alanin führte zu einer um eine Größenordnung reduzierten Bindungsaffinität, wohingegen der Austausch der Glutaminsäure an Position pY+1 nur eine marginale Änderung nach sich zog. Das Fehlen der Phosphatgruppe verursachte eine nahezu nicht mehr messbare Bindungsaffinität. Gleichmaßen wurde mit Mutationen der SH2-Domäne verfahren.<sup>[42,44]</sup> Vor allem Mutationen, die die pY-Bindungstasche beeinflussten ( $\beta$ B5, R  $\rightarrow$  A), resultierten in einer erheblichen Verschlechterung der Bindungsaffinität.

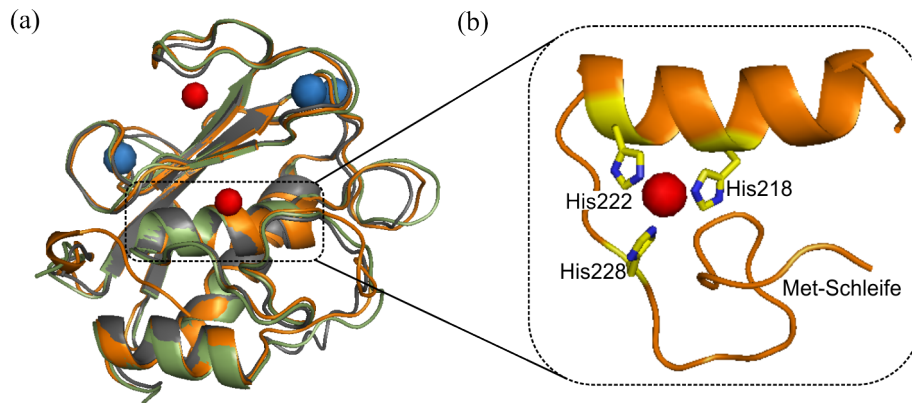
## 2.2 Die Matrix-Metalloproteasen & ihre Rolle als extrazellulärer Biomarker

Matrix-Metalloproteasen (MMPs) sind extrazelluläre Vertreter der Zink-abhängigen Endopeptidasen, deren Hauptfunktion in der Spaltung von Bindegewebe bzw. deren Bestandteile, wie Kollagen oder Elastin, liegt.<sup>[45]</sup> Die Fähigkeit, Proteine der extrazellulären Matrix abzubauen, ist essentiell für jede Zelle, um angemessen mit der unmittelbaren Umgebung zu interagieren, und ein wichtiger Bestandteil der Entwicklung, Morphogenese, Gewebereparatur und -umbildung.<sup>[46–48]</sup> Bisher konnten mehr als 20 MMPs im menschlichen Organismus identifiziert werden, die fortlaufend mit arabischen Zahlen gekennzeichnet wurden und sich anhand ihrer Struktur und der daraus resultierenden Funktion in diverse Gruppen einteilen lassen (Abbildung 2.3). Sämtliche MMPs besitzen eine ca. 20 Aminosäuren lange *N*-terminale



**Abbildung 2.3:** Strukturelle Gruppierung einer Auswahl an MMPs.<sup>[45]</sup>

Pre-Domäne, die als Signalpeptid für die Sekretion fungiert und nach vollendeter Synthese abgetrennt wird. Es folgt die ca. 80 Aminosäuren lange Pro-Domäne, deren Vollständigkeit das Enzym in einem latenten Zustand hält. Die Thiolfunktion eines Cysteins bindet dabei in der dreidimensionalen Struktur das Zink-Ion der katalytischen Domäne und verhindert somit eine für die Proteolyse notwendige Wasserkoordination. Die ca. 170 Aminosäuren lange, katalytische Domäne ist in den verschiedenen Vertretern stark konserviert, was anhand der Kristallstrukturen je eines Vertreters der vorgestellten MMP-Gruppen in Abbildung 2.4 a illustriert ist. Der Ausschnitt von MMP-7 zeigt detailliert die Koordination des Zink-Ions durch das Motiv HExxHxxGxxH, die mithilfe der Methionin-Schleife zusätzlich stabilisiert wird (Abbildung 2.4 b).<sup>[49–51]</sup> Mit Ausnahme der Matrilysine besitzen alle MMPs eine *C*-terminale, ca. 210 Aminosäuren lange Hämopepin-Domäne, die u. a. zur Erkennung von makromolekularen Substraten beiträgt. Die Gruppe der Gelatinasen verfügen im Besonderen innerhalb der katalytischen Domäne über zusätzliche Fibro-



**Abbildung 2.4:** Kristallstrukturen der katalytischen Domäne einer Auswahl an MMPs. (a) Kristallstruktur von MMP-2 (grün, PDB-ID: 1QIB), MMP-7 (orange, PDB-ID: 1MMQ) und MMP-13 (grau, PDB-ID: 456C). (b) Ausschnitt der Kristallstruktur von MMP-7 mit Zn-Bindungsmotiv HExxHxxGxxH und Methionin-Schleife (PDB-ID: 1MMQ). Zn<sup>2+</sup>- (rot) und Ca<sup>2+</sup>-Ionen (blau).

nektin Typ II-Einheiten, die die Assoziation von Kollagen und Elastin verstärken.

Die proteolytische Aktivität der MMPs ist eng mit einem karzinogenen Gewebewachstum verknüpft, da für eine Ausbreitung das Aufbrechen von strukturellen Barrieren durch den Abbau der extrazellulären Matrix notwendig ist. In zahlreichen, in der westlichen Welt weit verbreiteten Krebsarten, wie Darm-,<sup>[52–55]</sup> Brust-,<sup>[56–58]</sup> Haut-,<sup>[59,60]</sup> Prostata-<sup>[61–64]</sup> und Lungenkrebs,<sup>[65–67]</sup> konnte eine erhöhte Aktivität festgestellt werden.<sup>[68]</sup> Dabei sind die MMPs der normalen Bindegewebszelle und der Tumorzelle in der Tumormikroumgebung fehlreguliert.<sup>[69]</sup> Das Expressionslevel steigt von gesundem Gewebe, über gutartigen bis hin zu bösartigen Tumoren an, wodurch diese Enzyme geeignete Biomarker für die Diagnose und Bewertung von Therapien von metastasierenden Krankheiten darstellen. Extrazelluläre Zielmoleküle bieten weiterhin den praktischen Vorteil, dass die Sonden für deren Untersuchung keine Zellpermeabilität benötigen oder durch zusätzliche Verfahren, wie Elektroporation oder Mikroinjektion, in die Zelle eingebracht werden müssen. Die bislang gängigsten Methoden für die *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchung von MMPs basieren auf der Anfärbung mit Antikörpern oder auf der Verwendung von fluoreszenzmarkierten Substraten, die im folgenden Kapitel 2.3 beschrieben werden.<sup>[69–74]</sup> Es konnte in nahezu jedem Krebstyp ein erhöhter Expressionsgrad des kleinsten Vertreters MMP-7 (Zymogen: 28 kDa, Enzym: 19 kDa) festgestellt werden. Aufgrund dessen fungiert MMP-7 als ideales Zielmolekül für die Entwicklung eines generellen Assays für die Detektion und Untersuchung von MMPs im Kontext mit Erkrankungen.<sup>[75–79]</sup>

## 2.3 Peptidbasierte Konzepte für die Untersuchung von Proteinen und Proteaseaktivitäten

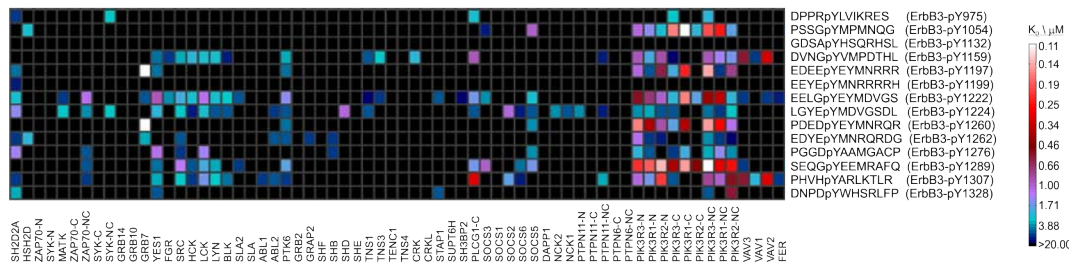
Die Anwendung in der Diagnostik beinhaltet die Bestimmung der Expressionslevel von in Krankheiten involvierten Proteinen sowie der Proteaseaktivität und kann zu der Bewertung möglicher Inhibitoren in der Therapie beitragen. Bildgebende Verfahren, die auf einer Assoziation der Reportermoleküle beruhen, können zusätzlich eine Lokalisierung der Zielmoleküle ermöglichen und für die Aufklärung von Wirkungsweisen genutzt werden. Die geschilderten, homogenen Detektionsmethoden bieten gegenüber heterogenen Verfahren den Vorteil einer schnellen und einfachen Durchführung, da auf umfangreiche Waschschrte verzichtet werden kann. Die Anforderungen an die eingesetzten Peptidsonden sind hoch. Sie sollen möglichst selektiv, sensitiv, direkt und ohne vorherige Aufarbeitung der biologischen Probe die Anwesenheit des Zielmoleküls signalisieren können. Um das zu untersuchende System zu vereinfachen, wird häufig auf ein verkürztes Peptidsegment aus einem der wechselwirkenden Proteine zurückgegriffen. Die eingesetzten Sequenzen können alternativ mittels Screening einer Peptidbibliothek oder Phagen-Display identifiziert und über einen Sequenzvergleich mit Datenbanken einem dazugehörigen Protein zugeordnet werden.<sup>[80,81]</sup> Bei der Entwicklung einer Sonde ist weiterhin zu beachten, dass keinerlei Beeinflussung des Bindungsverhaltens oder der Katalysegeschwindigkeiten vorliegt, um die Störung des ursprünglichen Systems zu minimieren. Es gibt vielfältige Ansätze für die Untersuchung von Proteinen und Proteaseaktivitäten in homogener Lösung, die auf einer assoziativen Wechselwirkung mit dem Zielmolekül basieren, von denen im Folgenden eine Auswahl präsentiert werden soll.

### 2.3.1 Fluoreszenzbasierte Systeme

Die Verwendung der Fluoreszenz als Signal für eine Protein-Peptid-Interaktion erfordert die Modifikation mindestens einer Komponente mit einem Fluorophor. Dieser sollte selektiv bei diversen Wellenlängen angeregt und ausgelesen werden können, um ein möglichst großes Signal/Hintergrund-Verhältnis zu gewährleisten. Die spektralen Charakteristika sollten sich weiterhin infolge der Wechselwirkung signifikant ändern, um eine sensitive Detektion zu ermöglichen.

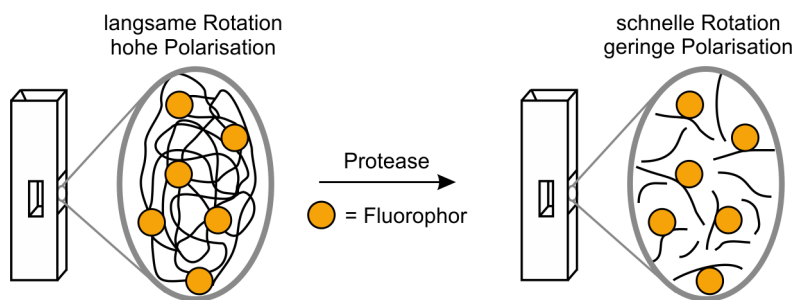
## Fluoreszenzpolarisation als Messgröße

Bei der Markierung mit nur einem Fluorophor ist die Untersuchung von Proteinen oder Proteaseaktivitäten unter Verwendung der Fluoreszenzpolarisation möglich.<sup>[82]</sup> Um eine signifikante Signaländerung zu erhalten, ist es erforderlich, dass die Wechselwirkung mit dem Zielmolekül zu einer veränderten Beweglichkeit des Fluorophors führt.<sup>[83]</sup> Eine eingeschränkte Rotation des Fluorophors wird zum Beispiel durch die Assoziation an ein Protein mit einer wesentlich höheren Molekülmasse erzeugt. Hause *et al.* nutzten diesen Ansatz, um ErbB-Rezeptoren, eine Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen, die durch einen extrazellulären Wachstumsfaktor aktiviert werden und deren intrazelluläre Phosphorylierung zur Rekrutierung von u. a. Proteinen mit SH2-Domänen führt, zu untersuchen.<sup>[84]</sup> Sie verwendeten 13-mere, terminal mit Rhodamin markierte Peptidsequenzen, die einem Ausschnitt aus den intrazellulären Domänen der Rezeptoren entsprachen, und titrierten diese gegen die isolierten SH2-Domänen. Anhand der resultierenden Affinitäten konnten sie ein theoretisches Interaktionsmuster erstellen, auf dem weitere Untersuchungen aufbauen konnten (Abbildung 2.5).



**Abbildung 2.5:** Potentielles Interaktionsmuster zwischen ErbB3-Rezeptor und diversen SH2-Domänen. Erstellt anhand der im Fluoreszenzpolarisationsexperiment ermittelten Affinitäten.<sup>[84]</sup>

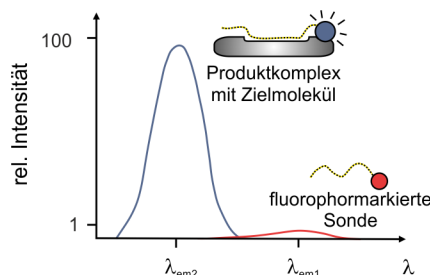
Die Messung der Fluoreszenzpolarisation bei der Untersuchung von Proteasen ist zumeist auf Vertreter beschränkt, deren Erkennungseinheiten ubiquitär vorkommen und das vielfach markierte Substrat an mehreren Positionen spalten. Dazu zählen beispielsweise Proteasen aus dem Verdauungstrakt, die Proteine nach diversen Aminosäuren hydrolytisch spalten. Durch die Prozessierung entstehen kurze Peptidfragmente, die eine deutlich erhöhte Beweglichkeit zum intakten Substrat und somit eine reduzierte Fluoreszenzpolarisation aufweisen (Abbildung 2.6). Es wurden bereits sensitive Methoden für die Untersuchung der Aktivitäten von Trypsin, Papain, Pepsin und der Proteinase K entwickelt, die BODIPY-<sup>[85]</sup> oder Tetramethylrhodamin (TMR)-markiertes  $\alpha$ -Casein<sup>[86]</sup> als universelles Substrat einsetzen.



**Abbildung 2.6:** Konzept eines auf Fluoreszenzpolarisation basierenden Assays für die Untersuchung von Proteasen.<sup>[82]</sup>

### Umgebungssensitive Sonden

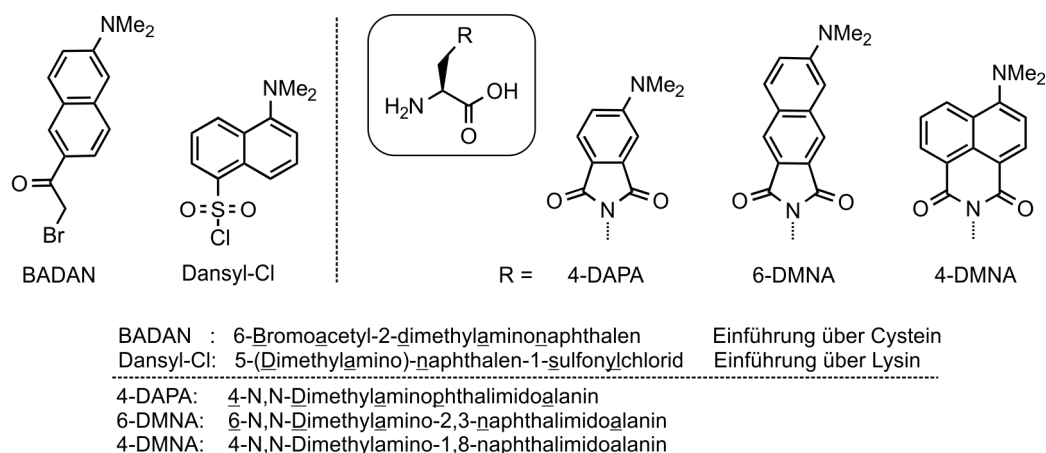
Ein weiteres Konzept beruht auf der Modifizierung einer nativen Peptidsequenz mit einem umgebungssensitiven Fluorophor. Dieser zeichnet sich durch eine Änderung seiner spektroskopischen Eigenschaften entsprechend seines unmittelbaren Umfeldes aus. Die meisten Vertreter weisen in polaren und protischen Lösungsmitteln ein schwaches Emissionssignal auf (rotes Spektrum in Abbildung 2.7). Der Übergang in



**Abbildung 2.7:** Konzept der umgebungssensitiven Sonden. Theoretische Fluoreszenzspektren im freien (rot,  $\lambda_{em1}$ ) und komplexierten Zustand (blau,  $\lambda_{em2}$ ).

eine hydrophobe Mikroumgebung, wie bei der Bindung an das Zielmolekül, resultiert in einem Anstieg der Fluoreszenzemission und einer Verschiebung des Maximums zu kleineren Wellenlängen (blaues Spektrum in Abbildung 2.7). Dieses dynamische Verhalten ist somit besonders für die Untersuchung der Assoziation von Peptiden an Proteine, die auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen, geeignet.<sup>[87,88]</sup>

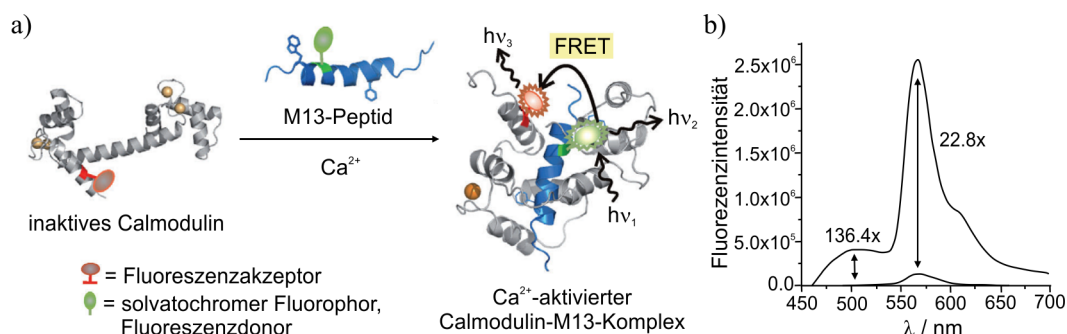
In der Arbeitsgruppe von Prof. Imperiali wurden zahlreiche umgebungssensitive Fluorophore entwickelt, die im Wesentlichen auf einer Dimethylaminophthalimid-Grundstruktur basieren (Abbildung 2.8). Im Einzelnen unterscheiden sie sich in ihren Anregungs- und Emissionswellenlängen und weisen gegenüber den kommerziell erhältlichen Farbstoffen, wie BADAN oder Dansylchlorid, bei der Anwendung erhebliche Vorteile, wie eine erhöhte Sensibilität bzgl. ihrer Mikroumgebung auf.<sup>[89]</sup>



**Abbildung 2.8:** Struktur und Nomenklatur einiger solvatochromer Fluorophore bzw. deren modifizierte Aminosäure.<sup>[89]</sup>

Die Ausprägung ihrer hypsochromen Verschiebung ist dabei abhängig von dem jeweiligen Zielmolekül und den eingesetzten Messbedingungen, wie z. B. der Pufferzusammensetzung. Sie können relativ einfach als modifizierte Aminosäure in die native Peptidsequenz durch die Substitution eines hydrophoben Restes eingeführt werden. Die Ermittlung dieser Position und die Auswahl eines geeigneten Fluorophors erfordert detaillierte Vorkenntnisse über die Struktur des Protein-Liganden-Komplexes, um den synthetischen Umfang für eine responsive Sonde zu reduzieren. Es gelang bereits die erfolgreiche Anwendung der jeweils optimierten peptidischen Sonde bei der Untersuchung einer Vielzahl von Proteinen und Proteindomänen, u. a. 14-3-3-Proteine,<sup>[90,91]</sup> isolierte SH2-Domänen der Gerüstproteine Crk und Abl,<sup>[92]</sup> MHC II-Proteine,<sup>[93]</sup> PDZ-Domänen<sup>[94]</sup> und das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende regulatorische Protein Calmodulin.<sup>[89]</sup> Ein bedeutender Vorteil der umgebungssensitiven Fluorophore ist die minimale Signalintensität der ungebundenen Sonden in dem größtenteils wässrigen Messpuffer, die meist zu einer hohen Sensitivität bei der Detektion des entsprechenden Zielmoleküls führt. Es konnte beispielsweise ein Komplex aus einem mit 4-DMN-modifiziertem Peptid und  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiviertem Calmodulin mit einem 963-fachen Signalunterschied zum ungebundenen Peptid nachgewiesen werden.<sup>[89]</sup> Ein Nachteil der umgebungssensitiven Fluorophore ist hingegen die hypsochrome Verschiebung des Emissionsmaximums in einen Wellenlängenbereich, in dem zahlreiche zelluläre Bestandteile ebenfalls emittieren und ein erhebliches Hintergrundsignal verursachen. Um diesem zu entgehen, entwickelte die Gruppe um Prof. Imperiali erst kürzlich ein Konzept, das einen umgebungssensitiven Fluorophor als Donor in einem auf FRET-basierenden Detektionssystem verwendet (Abbildung 2.9 a).<sup>[95]</sup> Durch die



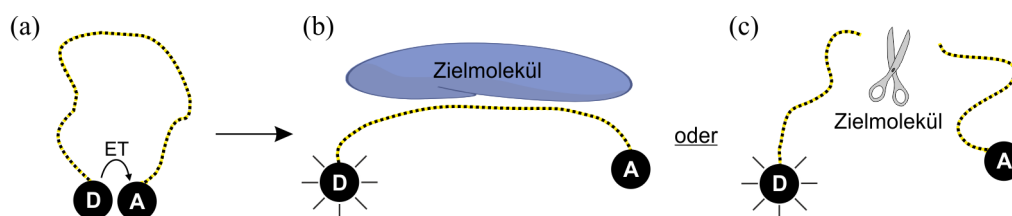


**Abbildung 2.9:** Detektion von  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiviertem Calmodulin. (a) Bindung des markierten M13-Peptids an das mit einem Fluoreszenzakzeptor modifizierte Calmodulin (PDB-ID: 2BBM). (b) Fluoreszenzspektren unter Verwendung von 4-DMN als solvatochromen Fluorophor und Alexa Fluor 555 als Fluoreszenzakzeptor.<sup>[95]</sup>

Koordination von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen wurde das mit einem Fluoreszenzakzeptor markierte Calmodulin aktiviert. Infolge dessen erfolgte eine Änderung der Proteinkonformation und die Bindung des mit dem solvatochromen Fluorophor 4-DMN markierten M13-Peptids. Der resultierende Energietransfer erzielte eine bathochrome Verschiebung von 160 nm und stellte eine weitere Emissionswellenlänge für die Auslesung zur Verfügung (Abbildung 2.9 b).

### Dualmarkierte Fluoreszenzsonden

Die duale Markierung der peptidischen Erkennungssequenzen mit den interagierenden Donor- und Akzeptoreinheiten erfolgt zumeist an den C- und N-Termini (Abbildung 2.10 a). Dies minimiert zum einen die Wahrscheinlichkeit, dass die Wechselwirkung der zentralen Peptidsequenz mit dem Zielmolekül durch die Modifikation gestört wird. Zum anderen wird der Abstand der Chromophore im gebundenen Zustand gesteigert (Abbildung 2.10 b), was zu einer hohen Signalveränderung bei



**Abbildung 2.10:** Konzept von dualmarkierten Fluoreszenzsonden. (a) Allgemeine Struktur im ungebundenen Zustand. Anstieg der Donoremission durch: (b) Rigidisierung infolge der Bindung an das Zielmolekül, (c) hydrolytische Spaltung durch das Zielmolekül. D = Donor, A = Akzeptor, ET = Energietransfer.

einem abstandsabhängigen Energieübertragungsmechanismus beitragen kann. Die Rigidisierung (b) oder Spaltung (c) der im Allgemeinen ungeordneten Struktur des Peptidsegments infolge der Wechselwirkung mit dem Zielmolekül verursacht eine Separierung der interagierenden Einheiten und führt somit zu einem Anstieg der Donoremission. Die Löschemanismen der Donoremission im ungebundenen Zustand sind vielfältig (Tabelle 2.2) und stehen im engen Zusammenhang mit der Art

**Tabelle 2.2:** Beispiele von Löschemanismen dualmarkierter Fluoreszenzsonden.

Löschemechanismus	Donor (D)	Akzeptor (A)
Bildung von H-Dimeren	Fluorescein, TMR, Alexa Fluor-Farbstoffe	
Bildung von Excimeren	Pyren, Perylen fluoreszente Proteine	
FRET	FAM, TMR, Alexa Fluor-488	Dabcyl, QSY-7
	Cy5.0, Cy5.5, Alexa Fluor-647	BHQ-3, QSY21, NIRQ820
PET	Ru(II)-Komplex	Methylviologen
	BODIPY	Tryptophan
	Fluorescein, 7-Methoxycoumarin	Thioamid

FRET = Förster-Resonanz-Energietransfer, PET = photoinduzierter Elektronentransfer.

des verwendeten Donor- und Akzeptormoleküls sowie deren Distanz und Orientierung zueinander. Fluorogene Akzeptorchromophore ermöglichen zusätzlich die Auslesung bei einer alternativen Wellenlänge, wodurch eine konzentrationsunabhängige Verhältnismessung unter Einbeziehung beider Emissionsmaxima für die Auswertung verwendet werden kann.

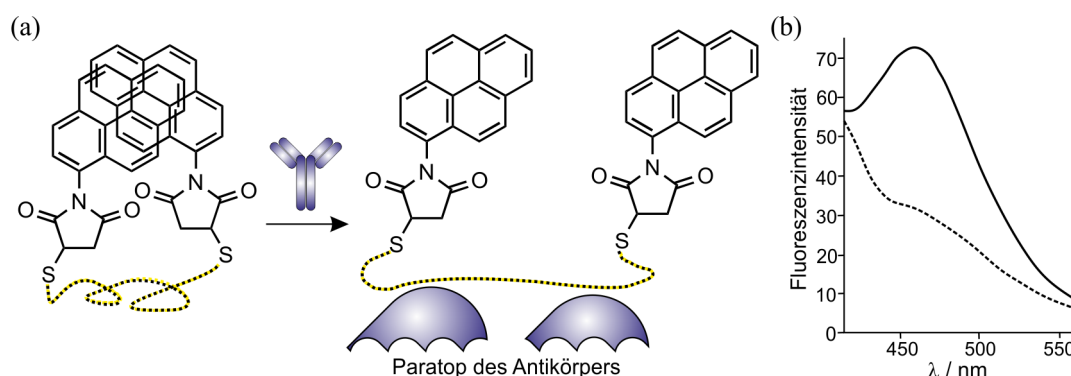
### ***Bildung von H-Dimeren***

Die Xanthen-Farbstoffe, wie Fluorescein oder Tetramethylrhodamin (TMR), können bei geringen Distanzen  $\leq 15 \text{ \AA}$  sogenannte intramolekulare H-Dimere bilden.<sup>[96,97]</sup> Dies ist ein Grundzustandskomplex, der einen Verlust der Fluoreszenzintensität und eine bathochrome Verschiebung der Absorptionsbande der Sonde nach sich zieht. Die duale Markierung mit Homo- oder Heterodimeren wurde bereits für die Untersuchung von Antikörpern,<sup>[98]</sup> der SH2-Domäne der Phosphoinositol-3-Kinase<sup>[99]</sup> und den Proteasen Trypsin<sup>[99]</sup> und Elastase<sup>[96,100]</sup> verwendet.

### ***Bildung von Excimeren***

Einige fluorogene, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, wie Pyren oder Perylen, sind in der Lage bei einem Abstand von ca.  $10 \text{ \AA}$  und geeigneter geometrischer Orientierung zweier Monomere nach der Anregung ein *Excited Dimer* (kurz: Exci-

mer) zu bilden.<sup>[101]</sup> Das Emissionsspektrum ist je nach Gleichgewichtslage durch diverse Monomer- und eine charakteristische Excimerbande gekennzeichnet. Dies bietet, bei geeigneter Markierung der Sonde, die Möglichkeit das Monomer-Excimer-Gleichgewicht für die Detektion des Zielmoleküls zu nutzen. Das Fluorophor Pyren wurde bereits vielfach für die Untersuchung von nukleinsäurebasierten Zielmolekülen<sup>[102–106]</sup> oder Ionen<sup>[107,108]</sup> verwendet. Beispiele in der Proteindetektion sind hingegen selten und beruhen meist auf der Interaktion mit DNA-Aptameren.<sup>[109–111]</sup> Der Einsatz in peptidbasierten SONDENSYSTEMEN ist nur in einer handvoll Publikationen bis zum jetzigen Zeitpunkt beschrieben. Oh *et al.* verwendeten beispielsweise das Monomer-Excimer-Gleichgewicht bei der Detektion eines Antikörpers, der einen 6-meren Ausschnitt aus dem HIV-1-Matrixprotein p17 bindet (Abbildung 2.11 a).<sup>[112]</sup> Die Erkennungssequenz wurde dabei terminal mit Pyreneinheiten über



**Abbildung 2.11:** Detektion eines Antikörpers mit einer excimerbasierten Peptidsonde. (a) Strukturelle Reorganisation der Sonde infolge der Bindung am Antikörper anti-HIV 1 p17. (b) Fluoreszenzspektren der Sonde vor (—) und nach (---) Zugabe des Antikörpers.<sup>[112]</sup>

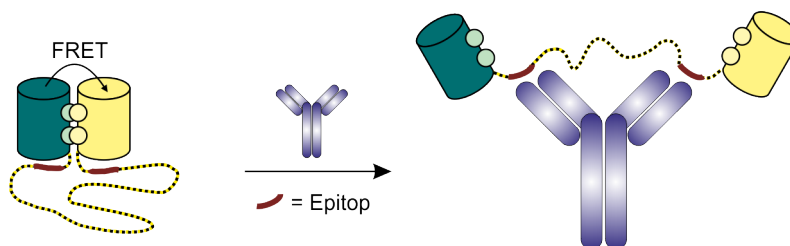
eine Thiol-Maleinimid-Kupplung modifiziert. Die ungebundene Sonde wies eine hohe Excimeremission ( $\lambda_{em, Excimer} = 480 \text{ nm}$ ) nach einer Anregung im nahen UV-Bereich ( $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$ ) auf, die auf die hydrophobe Wechselwirkung beider Pyreneinheiten zurückzuführen war (Abbildung 2.11 b). Infolge der Assoziation am Paratop des Antikörpers wurde das Peptid in eine gestreckte Konformation überführt und somit die Pyreneinheiten voneinander separiert. Dies ging mit einer Reduktion des Excimer-signals um 50 % einher, wodurch es nur noch als schwache Schulter der Monomer-emission im Fluoreszenzspektrum detektierbar war. Das Konzept ist ebenfalls für die Untersuchung der proteolytischen Aktivität geeignet, was Ahn *et al.* am Beispiel der Serinprotease Trypsin demonstrierten.<sup>[113]</sup> Die Prozessierung durch die Protease resultierte in einem Verlust der Excimer- und einem Anstieg der Monomeremission

( $\lambda_{em, Monomer} = 380, 400 \text{ nm}$ ). Der Nachteil der soeben geschilderten Beispiele ist jedoch, dass sie auf einer Reduktion der Excimer- und einem Anstieg der Monomeremission basieren. Für biologische Anwendungen ist es jedoch erstrebenswert einen Anstieg des Excimersignals zu induzieren, da dadurch eine hohe Stokes-Verschiebung und eine lange Fluoreszenzlebensdauer gegeben ist, die für zeitaufgelöste Messungen genutzt werden könnte. Peptidbasierte Konzepte, die die Excimerbildung als vorrangiges Signal für die Detektion von Proteinen verwenden, sind bisher nicht bekannt.

### **FRET**

Ein häufiger Ansatz bei der Löschung der Donoremmission ist die Verwendung des physikalischen Prozesses FRET. Dieser setzt eine spektrale Überlappung der Donoremmission mit der Akzeptorabsorption voraus und kann über Distanzen bis zu  $100 \text{ \AA}$  effizient eingesetzt werden.<sup>[114]</sup> Diese Methodik ist besonders beliebt bei der Entwicklung von Proteasesonden, da die Spaltung der Peptidsequenz eine quantitative Separierung der interagierenden Chromophore gewährleistet und somit eine vollständige Unterbrechung des strahlungsfreien Energietransfers. Dies führt zu einem hohen Signalanstieg der Donoremmission bei der Prozessierung durch die Protease und wurde bereits für die Untersuchung der HIV-Protease,<sup>[115]</sup> der Matrix-Metalloprotease-7 (MMP-7),<sup>[77]</sup> von Caspasen<sup>[116–118]</sup> und der Urikinase<sup>[119]</sup> erfolgreich eingesetzt. Die Bindung an ein Protein oder einer Proteindomäne erzeugt hingegen zumeist keinen ausreichend großen Abstand zwischen den interagierenden Chromophoren, um einen FRET quantitativ zu unterbinden. Ein seltenes Beispiel ist die Detektion des HIV 1 p17-Antikörpers mit einer Peptidsequenz, die zwei identische Epitope enthielt und terminal mit fluorogenen Proteinen markiert wurde (Abbildung 2.12).<sup>[120]</sup> Im ungebundenen Zustand erfolgte eine effiziente Interaktion zwischen den modifizierten Proteinen, die in einer hohen Signalintensität der Akzeptoremmission resultierte. Die Bindung durch das Zielmolekül verursachte einen Abstand von  $120\text{--}170 \text{ \AA}$  zwischen den fluorogenen Einheiten, wodurch der Energietransfer quantitativ unterbrochen und die Akzeptoremmission um 66 % reduziert wurde.

Häufig eingesetzte Donorfluorophore, die im sichtbaren Wellenlängenbereich emittieren, sind Carboxyfluorescein (FAM), TMR, diverse fluoreszente Proteine<sup>[121]</sup> sowie eine Auswahl an Alexa Fluor-Farbstoffen.<sup>[117]</sup> Bei der Messung in Geweben und anderen biologischen Medien ist es von Vorteil Fluorophore, wie die Cyanin-Farbstoffe Cy5.0<sup>[119]</sup> und Cy5.5,<sup>[77]</sup> zu verwenden. Sie können orthogonal zu den interferierenden, autofluoreszenten Komponenten angeregt werden und emittieren im nahen Infrarot (NIR)-Bereich, bei dem keine Schwächung der Signalintensität

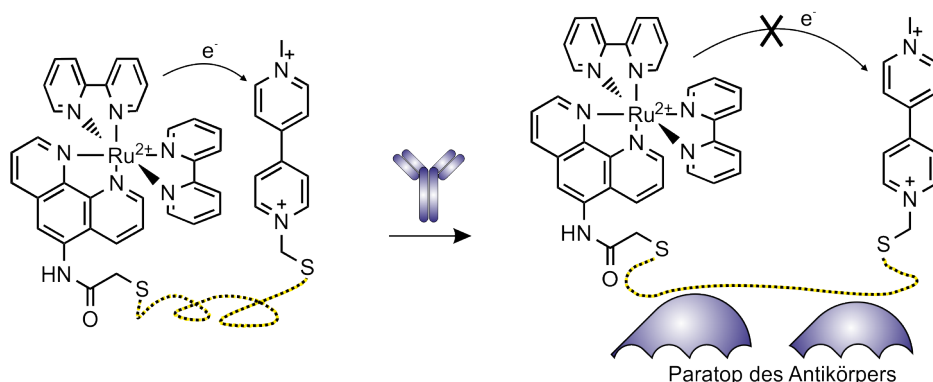


**Abbildung 2.12:** Detektion eines Antikörpers mit einer dualmarkierten Peptidsonde unter Verwendung von fluoreszenten Proteinen.<sup>[120]</sup>

durch endogene Absorber erfolgt.<sup>[122]</sup> Auf der Basis des Wellenlängenbereichs der Donoremision werden die Akzeptorchromophore ausgewählt. Dabei werden fluorige Akzeptorchromophore, wie QSY-7, QSY21,<sup>[116]</sup> NIRQ820<sup>[77]</sup> sowie diverse fluoreszente Proteine, von nicht fluorogenen, u. a. Dabcyl und *Black Hole Quencher-3* (BHQ-3),<sup>[119]</sup> die die aufgenommene Energie in Form von Wärme abgeben, unterschieden.

### PET

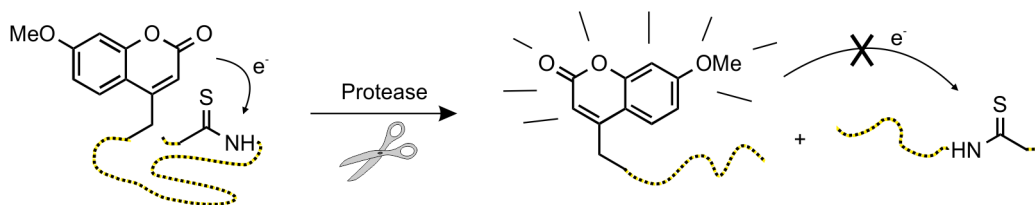
Ein weiterer Löschmechanismus ist der photoinduzierte Elektronentransfer (PET), der maßgeblich von den Redoxpotentialen des Donor- und Akzeptormoleküls abhängt.<sup>[123]</sup> Für die Detektion eines HIV-spezifischen Antikörpers wurde z. B. ein Ruthenium(II)-Komplex als Elektronendonator und das aus dem Photosystem I der Photosynthese bekannte Methylvinologen als Elektronenakzeptor eingesetzt (Abbildung 2.13).<sup>[124]</sup> Es konnte in einem *in vitro*-Assay ein 6-facher Anstieg der Emis-



**Abbildung 2.13:** Detektion eines Antikörpers mit einer dualmarkierten Peptidsonde unter Anwendung des photoinduzierten Elektronentransfers.<sup>[124]</sup>

sion des Ru(II)-Komplexes erzielt werden. Ein guter Elektronenakzeptor für zahlreiche organische Fluorophore ist die Aminosäure Tryptophan,<sup>[125–127]</sup> was bei der Entwicklung einer Sonde für die Untersuchung von peptidischen Makromolekülen

berücksichtigt werden sollte und auch bewusst bei der Dualmarkierung einer peptidischen Antikörpersonde verwendet wurde.<sup>[128]</sup> Goldberg *et al.* entwickelten einen interessanten Ansatz für die Untersuchung von Proteinen, deren Wechselwirkung mit einer Peptidsonde infolge der Markierung mit voluminösen Chromophoren maßgeblich inhibiert wird.<sup>[129]</sup> Die Löschung der Fluorophoremission erfolgte durch eine Thioamid-Funktion, deren Einführung nur minimale Änderungen der natürlichen Peptidstruktur nach sich zog (Abbildung 2.14). Am Beispiel von 7-Methoxycoumarin

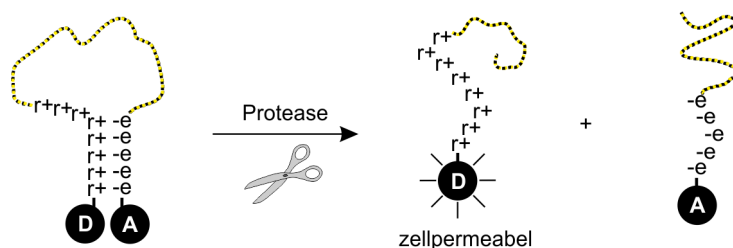


**Abbildung 2.14:** Detektion von Proteasen mit Thioamid-modifizierten Peptidsonden.<sup>[129]</sup>

als Elektronendonator demonstrierten sie die Detektion von Proteasen, wie Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin, mit einem durchschnittlichen Signalanstieg um das Doppelte. Zudem zeigten sie, dass die Thioamid-Einheit als Elektronenakzeptor für eine Vielzahl an Fluorophoren fungieren kann.<sup>[130]</sup>

Ein weiterer Löschmechanismus, der sich auf einen unmittelbaren Kontakt der Chromophore beschränkt, ist die Entvölkerung des angeregten Zustands durch Stöße.<sup>[131]</sup> Die DabcyI-Gruppe ist beispielsweise bei Abständen von nur wenigen Å in der Lage die Fluoreszenz durch Stoßdeaktivierung zu löschen, was bei der Untersuchung der Renin-Protease bereits Anwendung fand und einen 8-fachen Signalanstieg des eingesetzten NIR-Fluorophors verursachte.<sup>[23]</sup>

Die wahrscheinlich größte Herausforderung bei der Entwicklung von dualmarkierten Fluoreszenzsonden besteht darin, das Hintergrundsignal zu minimieren, um die Responsivität zu erhöhen. Die Löscheffizienz der freien Sonde ist maßgeblich von der natürlichen Konformation des Peptidsegments und der Affinität der Marker untereinander abhängig. Eine Methode, um die Interaktion zwischen Donor- und Akzeptorchromophor zu verstärken, erstellten Chen *et al.* am Beispiel einer MMP-7-spezifischen Sonde.<sup>[132]</sup> Sie versahen das Erkennungsmotiv mit Polyarginin und -glutamin-Sequenzen, wodurch eine haarnadelförmige Struktur aufgrund der elektrostatischen Wechselwirkung entstand (Abbildung 2.15). Die strukturierten Konjugate besaßen eine niedrigere Hintergrundfluoreszenz als vergleichbare, unstrukturierte Sonden. Nach der Spaltung des Peptidsegments dissoziierte die Struk-



**Abbildung 2.15:** Detektion einer Protease mit einer strukturierten Peptidsonde.<sup>[132]</sup>

tur und erzeugte einen Anstieg der Donoremission. Gleichzeitig wies das polykationische Spaltungsprodukt eine Zellpermeabilität auf, was die Möglichkeit einer simultanen diagnostischen und therapeutischen Anwendung (“see & treat”) eröffnet. Einen anderen Ansatz verfolgten Thurley *et al.*<sup>[23]</sup> und Oh *et al.*,<sup>[128]</sup> indem sie die sequenzspezifische Hybridisierung von Peptidnukleinsäuren für die Strukturierung peptidbasierter Fluoreszenzsonden ausnutzten. Dieser Sondentyp ist Bestandteil des Kapitels 2.4.3 und wird dort detailliert erläutert.

### 2.3.2 Signalamplifizierung über Mehrfachpräsentation

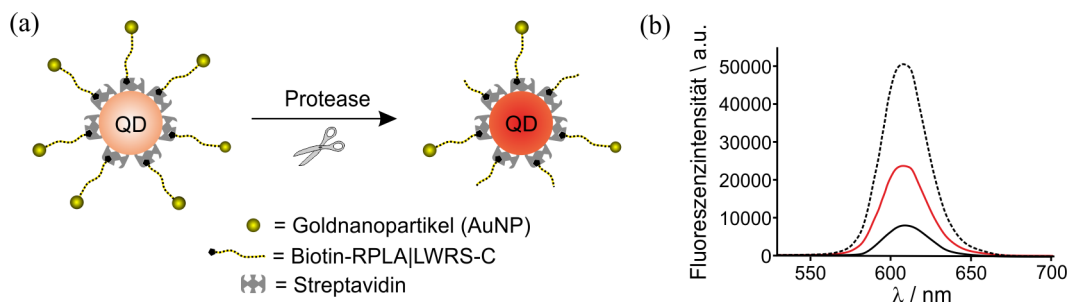
Nanopartikel bieten die Möglichkeit dem Zielmolekül mehrere markierte Liganden parallel zu präsentieren und somit einen höheren Signalanstieg pro Molekül im Vergleich zu einem einzelnen Liganden zu erreichen. Von dieser Responsivität wird vor allem in der Untersuchung von Proteaseaktivitäten profitiert.<sup>[133]</sup> Anwendungen, die auf einer Assoziation des Zielmoleküls am Partikel basieren, sind hingegen aufgrund der erhöhten sterischen Abschirmung der immobilisierten Liganden nach erfolgter Bindung selten. Die Partikel können in der Funktionalität des Trägermaterials sowie in der Art der Immobilisierung der Liganden auf der Partikeloberfläche variieren.

#### Quantum Dots

Quantum Dots (QDs) sind aus einem Halbleiterkern bestehende, sphärische Partikel, die über einzigartige spektrale Eigenschaften verfügen. Das breite Absorptionsspektrum erlaubt die Anregung mit verschiedensten Lichtquellen, um ein Signal zu erzeugen. Des Weiteren erfolgt die Emission in einem schmalen Wellenlängenbereich mit einen bis zu 100-fach höheren Extinktionskoeffizienten als der von traditionellen organischen Farbstoffmolekülen.<sup>[134]</sup> Dadurch wird eine sehr sensitive Detektion von Biomolekülen in fluoreszenzbasierten Assays ermöglicht, bei denen sie häufig als Fluoreszenzdonoren eingesetzt werden. Durch die Variation des Partikeldurchmes-

sers können QDs verschiedener Emissionswellenlängen relativ simpel hergestellt und deren Oberfläche entsprechend des Einsatzgebiets funktionalisiert werden. Ihre lange Fluoreszenzlebensdauer (30-100 ns) gestattet außerdem eine zeitverzögerte Messung in autofluoreszenten Medien, was u. a. bei der Bildgebung in lebenden Zellen von Vorteil sein kann.<sup>[135–140]</sup>

Kim *et al.* setzten beispielsweise mit Streptavidin-funktionalisierte QDs verschiedener Emissionswellenlängen (SA-QD525, SA-QD605, SA-QD655, 15–20 nm Durchmesser) für die Multiplexdetektion von Proteasen ein (Abbildung 2.16 a).<sup>[76]</sup> Die



**Abbildung 2.16:** Detektion von Proteasen mit einem Streptavidin-funktionalisierten QD und einem AuNP-Peptid-Biotin-Konjugat. (a) Schematische Struktur und Funktionsprinzip. (b) Fluoreszenzspektren des QDs (---) und QD-AuNP-Konstrukts vor (—) und nach (—) Spaltung durch MMP-7.<sup>[76]</sup>

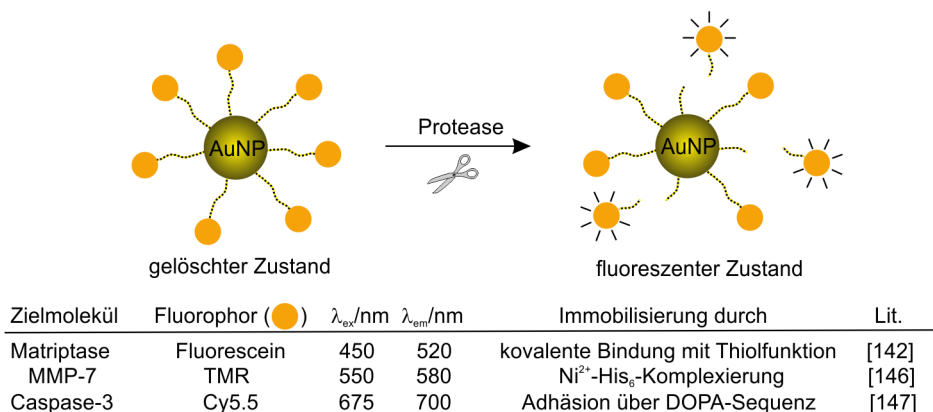
Löschung der Fluoreszenz erfolgte mit einem weiteren Nanopartikel aus Gold (AuNP, 1.4 nm Durchmesser), der als Fluoreszenzakzeptor über einen breiten Wellenlängenbereich einsetzbar ist und selbst nicht fluoresziert. Das jeweilige peptidische Substrat fungierte als Linker zwischen beiden Partikeln. Über ein *C*-terminales Cystein wurde das Peptid auf der AuNP-Oberfläche kovalent immobilisiert. Die Einführung einer Biotin-Einheit, entweder *N*-terminal oder über eine Lysinseitenkette, ermöglichte die Assoziation mit dem Streptavidin-funktionalisierten QD. Das intakte Konstrukt wies ein minimales Hintergrundsignal infolge der Proximität beider Nanopartikel auf (schwarze Linie in Abbildung 2.16 b). Bei einer Prozessierung durch eine Protease wurde der AuNP von dem QD separiert, was in einem Signalanstieg der QD-Emission resultierte (rote Linie in Abbildung 2.16 b). In homogener Lösung konnte allerdings nur 47 % der maximalen Emission des QDs (gestrichelte Linie in Abbildung 2.16 b) nach der Spaltung durch MMP-7 erhalten werden.

## Goldnanopartikel

Ein weiteres partikelbasiertes Konzept bei der Entwicklung von responsiven Biosensoren basiert auf der Verwendung von Goldnanopartikeln (AuNPs) (Abbildung



2.17).<sup>[141]</sup> Der AuNP fungiert nicht nur als Trägermaterial für die fluoreszenzmarkierten Substrate, sondern auch als effektiver Fluoreszenzakzeptor für eine Vielzahl von Fluorophoren. Infolge der Prozessierung durch das Zielmolekül erfolgt eine Separierung des Fluorophors von dem AuNP, was in einem Anstieg des Emissionsignals resultiert. Deng *et al.* stellten beispielsweise einen Assay für die *in vitro*-

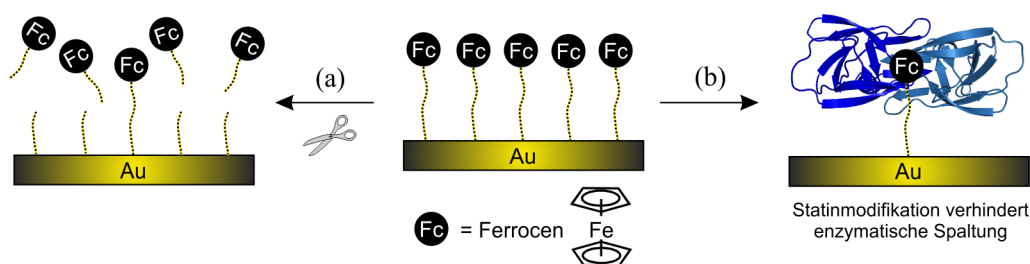


**Abbildung 2.17:** Untersuchung von Proteaseaktivitäten mithilfe funktionalisierter Goldnanopartikel.

und *in vivo*-Detektion der Matriptase vor,<sup>[142]</sup> einer transmembranen Serinprotease, die in Tumorzellen hoch exprimiert wird und somit einen wichtigen Biomarker für die Bewertung von Krebstherapien verkörpert.<sup>[143–145]</sup> Sie immobilisierten bis zu 300 Fluorescein-markierte Peptid-Konjugate auf einem AuNP mit 20 nm Durchmesser und erreichten eine Löscheffizienz von 85 % im intakten Zustand. Nach der Inkubation mit Krebszellen konnte ein eindeutiger Fluoreszenzanstieg detektiert werden, der mit dem Expressionslevel der Protease korrelierte. Einen alternativen Ansatz verfolgten Park *et al.* bei der Untersuchung der MMP-7-Aktivität.<sup>[146]</sup> Die Immobilisierung der mit TMR und einem His<sub>6</sub>-Tag funktionalisierten Peptidliganden erfolgte über eine Komplexierung mit  $Ni^{2+}$ -Ionen an einem mit Carboxylgruppen beladenen AuNP mit 5 nm Durchmesser. Sie konnten jedoch nur einen 3-fachen Signalanstieg bei einer Beladung mit 100 Liganden erhalten. Eine Möglichkeit zur Detektion von Caspase-3 in lebenden Zellen und Gewebe entwickelte Sun *et al.* unter Verwendung von Cy5.5 als fluoreszente Komponente.<sup>[147]</sup> Die Beladung mit 120 Liganden pro Partikel (38 nm Durchmesser) wurde mithilfe einer aus den Adhäsionsproteinen der Muschel inspirierten DOPA-Peptidsequenz (DOPA = 3,4-Dihydroxyphenylalanin) realisiert und erzeugte einen maximal 5-fachen Fluoreszenzanstieg bei Anwesenheit der Caspase-3.

### 2.3.3 Elektrochemische Systeme

Die Verwendung von elektrochemischen Signalen bei der Untersuchung von Protein-Peptid-Interaktionen beruht im Wesentlichen auf einer messbaren Veränderung der Stromstärke bei der Bindung des Proteins an den Liganden oder der Prozessierung des entsprechenden Substrates durch die Protease. Dabei wird meist das Substrat auf einer Goldoberfläche durch eine kovalente Bindung mit einer zusätzlich terminal eingeführten Cystein-Einheit immobilisiert. Liu *et al.* entwickelten z. B. einen Sensor für die Detektion von MMP-7 (Abbildung 2.18 a).<sup>[75]</sup> Die Versuchslösungen wurden dabei über eine Chipoberfläche geleitet, die mit dem Ferrocen-konjugierten Peptid funktionalisiert war. Bei einer Prozessierung durch die Protease zeigte sich eine signifikante Veränderung in den gemessenen Potentialen aufgrund des Verlustes der Ferrocen-Einheit, deren Intensität mit der Proteasekonzentration korrelier-

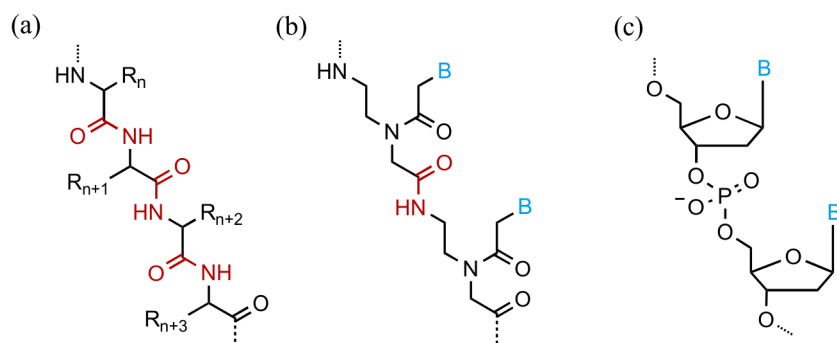


**Abbildung 2.18:** Untersuchungen von Protein-Peptid-Interaktionen mit Ferrocen-konjugierten Peptidsonden. Detektion von (a) MMP-7<sup>[75]</sup> & (b) HIV-1-Protease (PDB-ID: 5HVP).<sup>[148,149]</sup>

te. Von demselben Prinzip machten Kerman *et al.* bei der Untersuchung von HIV-relevanten Proteinen, wie der HIV-1 Integrase, Reversen Transkriptase und Protease, die maßgeblich an der Vermehrung der Viren beteiligt sind, Gebrauch (Abbildung 2.18 b).<sup>[148,149]</sup> Um eine Spaltung des Substrats zu verhindern, substituierten sie die jeweilige Position gegen das Aminosäureanalogon Statin.

## 2.4 PNA als multifunktionales Werkzeug

Die Peptidnukleinsäure (PNA) wurde erstmalig 1991 von Nielsen *et al.* beschrieben<sup>[150]</sup> und ist ein DNA-Analogon, bei dem das negativ geladene Desoxyribosephosphat-Rückgrat gegen ein neutrales, achirales und zumeist aus N-(2-Aminoethyl)glycin (Aeg)-Einheiten bestehendes Rückgrat substituiert ist (Abbildung 2.19).<sup>[151,152]</sup> Die Nukleobasen sind dabei über einen Methylen-carbonyl-Linker an das peptidische Gerüst geknüpft. Die PNA-Oligomere können relativ einfach unter Verwen-



**Abbildung 2.19:** Vergleich der chemischen Grundstruktur von (a) Peptiden, (b) PNA aus Aeg-Einheiten und (c) DNA. R = Seitenkette der entsprechenden Aminosäure, B = Nukleobase, Aeg = N-(2-Aminoethyl)glycin.

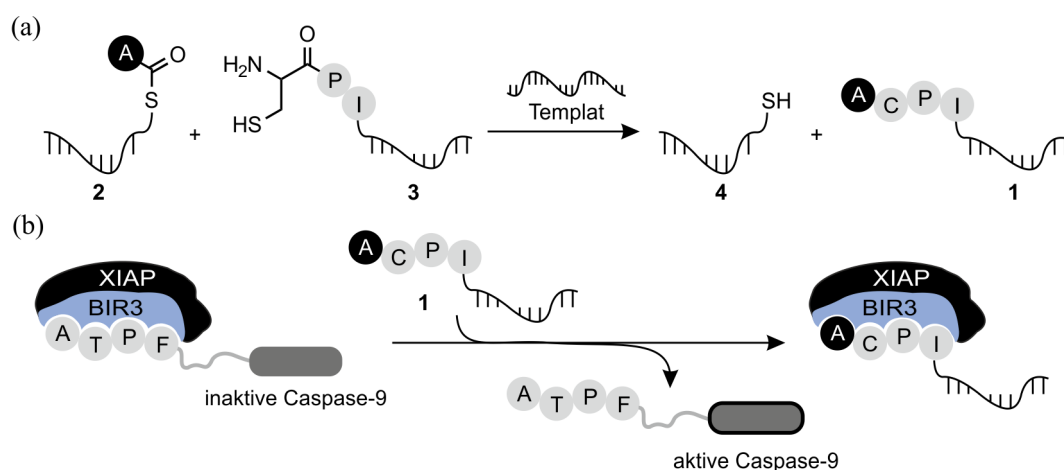
derung von standardisierten Protokollen für die Peptidfestphasensynthese hergestellt werden und besitzen im Vergleich zu Peptiden oder DNA-Oligomeren eine hohe Stabilität in biogenen Matrizen wie Seren, Zelllysaten und -extrakten, die sie für den Einsatz in biologischen Anwendungen prädestiniert.<sup>[153]</sup> Untersuchungen der thermischen Stabilität von 10-meren, sequenzanalogen Oligonukleotid-Duplexen zeigten, dass die intermolekularen Schmelztemperaturen in der Reihenfolge DNA·DNA < PNA·DNA (parallel) < PNA·DNA (antiparallel) < PNA·PNA steigen, was wahrscheinlich auf die fehlende elektrostatische Abstoßung des PNA-Rückgrates zurückzuführen ist. Die strukturellen Unterschiede der jeweiligen Duplexe konnten anhand von Röntgenkristallstrukturanalysen und NMR-spektroskopischen Untersuchungen bereits detailliert charakterisiert und spezifiziert werden.<sup>[154,155]</sup>

Die große Affinität zu komplementären DNA-, wie auch RNA-Sequenzen, bei gleichzeitig hoher Sequenzspezifität, empfiehlt die PNA für den Gebrauch als Hybridisierungssonde.<sup>[156–158]</sup> In der Tat wurden PNA-Sonden vielfach in der diagnostischen Detektion spezieller Sequenzmotive, die verschiedene Krankheitsneigungen widerspiegeln, eingesetzt. Zahlreiche Konzepte beruhten auf katalytisch ablaufenden, templatvermittelten Reaktionen, um anhand der Veränderung eines Fluoreszenzsignals den Nachweis geringster Mengen des jeweiligen Templatstrangs zu ermöglichen. Sie beinhalteten sowohl die Übertragung von funktionalen Gruppen zwischen zwei benachbart hybridisierten PNA-Sonden<sup>[159–161]</sup> sowie deren Verknüpfung,<sup>[162–164]</sup> als auch die interne Markierung mit einem interkalierenden Farbstoffmolekül.<sup>[165–167]</sup> Weiterhin wurden strukturell festgelegte PNA-PNA-Duplexe in der Gruppe von Prof. Diederichsen genutzt, um ein vereinfachtes Modell für die Membranfusion zu generieren und somit die systematische Untersuchung von Fusionsprozessen zweier Vesikel zu ermöglichen.<sup>[168]</sup>

Der Einsatz von PNA-Konjugaten in den Proteinwissenschaften ist bisher, im Vergleich zu den zuvor erwähnten Untersuchungen mit den Nukleinsäuren, selten. Jedoch lassen sich auch in diesem Forschungsgebiet die herausragenden Eigenschaften der PNA nutzen.

### 2.4.1 Templatvermittelte Generierung von bioaktiven Peptiden

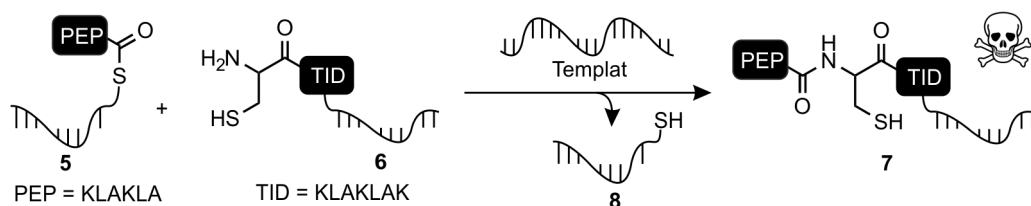
Die sequenzspezifische Hybridisierung von PNA-Konjugaten kann in der molekularen Therapie, die selektiv auf erkrankte Zellen und Gewebe wirken soll, verwendet werden. Die nukleinsäurekodierte Information, die zumeist veränderte Konzentrationen und Sequenzen von RNA-Molekülen darstellt, wird dabei genutzt, um in einer templatunterstützten Reaktion einen potentiellen Wirkstoff zu generieren. Erben *et al.* gelang es beispielsweise mithilfe von PNA-Peptid-Konjugaten in einem zellfreien, funktionalen Assay unter Verwendung von rekombinanten Domänen und Zelllysate eine Caspase zu aktivieren, die maßgeblich am programmierten Zelltod beteiligt ist.<sup>[169,170]</sup> Das proapoptotische Peptidsegment ACPI des Konjugats **1** wurde durch einen templatvermittelten Aminoacyl-Transfer zwischen den benachbart am Templat hybridisierten Sonden **2** und **3** nach dem Prinzip der nativen chemischen Ligation (NCL) generiert (Abbildung 2.20 a). Dabei wurde eine Alanyl-Einheit von dem Thioester-modifizierten Konjugat **2** auf ein *N*-terminales Cystein des PNA-Peptid-Konjugats **3** übertragen. Als Templat fungierte ein DNA-Abschnitt, der für



**Abbildung 2.20:** Templatvermittelte Generierung eines bioaktiven Peptids. (a) Nukleinsäurekatalysierte Aminoacyltransferreaktion unter Bildung eines proapoptotischen PNA-Peptid-Konjugats **1**. (b) Wirkung des PNA-Peptid-Konjugats **1**.<sup>[169,170]</sup>

einen Teil der karzinogenen Form des Signaltransduktionsproteins Ras kodiert. Das *in situ* entstandene PNA-Peptid-Konjugat **1** war in der Lage das Bindungsmotiv der inaktivierten Caspase-9 von der BIR3-Domäne des Inhibitorproteins XIAP (engl. *X-linked inhibitor of apoptosis proteins*) zu verdrängen, was in einer Aktivierung der Caspase-9 resultierte (Abbildung 2.20 b). Das Nebenprodukt **4** zeigte hingegen keinerlei biologische Aktivität. Die Reaktion konnte katalytisch, d. h. mit einer substöchiometrischen Menge an Templat, durchgeführt werden, was aufgrund der geringen Konzentrationen an Templatstrang in der Zelle zur Erzeugung effektiver Wirkstoffkonzentrationen von Vorteil ist.

Es gelang in weiterführenden Experimenten längere Peptidfragmente nach dem Prinzip der NCL zu übertragen, um das zelltoxische Peptidmotiv (KLAKLAK)<sub>2</sub> zu generieren (Abbildung 2.21).<sup>[171]</sup> Als Templat für die benachbarte Hybridisierung der funktionalisierten PNA-Sonden **5** und **6** fungierte die mRNA, die für XIAP kodiert und eine erhöhte Konzentration in Tumorzellen aufweist. Es konnte erfolgreich

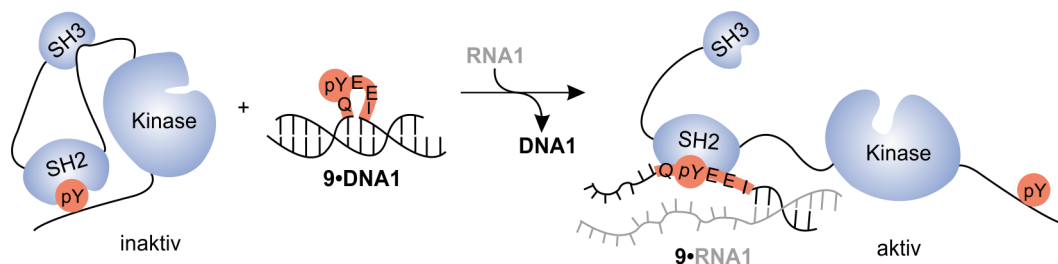


**Abbildung 2.21:** RNA-vermittelter Peptidyltransfer unter Bildung des zelltoxischen PNA-Peptid-Konjugats **7**.<sup>[171]</sup>

das PNA-Peptid-Konjugat **7** templatvermittelt hergestellt werden und zeigte bei der Inkubation mit HeLa-Zellen eine Inhibition der Zellvermehrung um mehr als 50 %. Das Nebenprodukt **8** sowie die Eduktsonden **5** und **6** wiesen keine zelltoxische Wirkung auf.

## 2.4.2 Hybridisierungsbasierte Kontrolle der Peptidkonformation

Eine andere Idee, bei der die sequenzspezifische Hybridisierung von PNA-Peptid-Konjugaten mit Nukleinsäuresequenzen genutzt wird, wurde von Röglin *et al.* vorgestellt.<sup>[172,173]</sup> Sie entwickelten am Beispiel der Src-Kinase ein Konzept, das einzelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen als strukturgebendes Element verwendet, um die Konformation des zentralen Peptidsegments eines PNA-Peptid-PNA-Konjugats festzulegen und dadurch die Erkennung und Bindung zu Proteindomänen in Proteininteraktionsnetzwerken zu steuern (Abbildung 2.22). Die pentamere Peptidsequenz

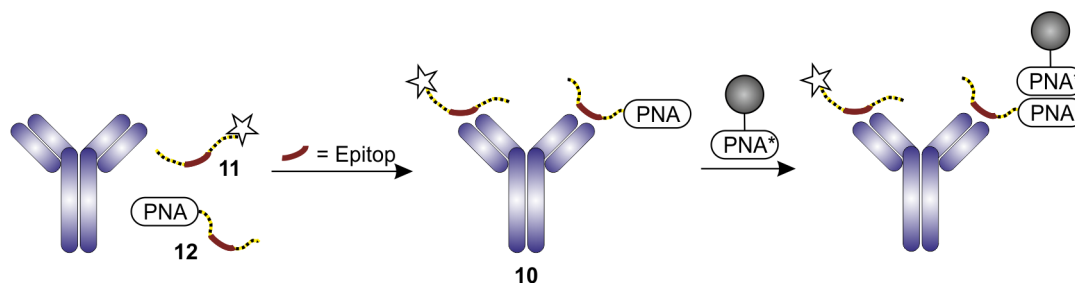


**Abbildung 2.22:** Regulierung der Src-Kinaseaktivität durch hybridisierungs-basierte Steuerung der Peptidkonformation.<sup>[173]</sup>

QpYEEI wird dabei von der SH2-Domäne der Src-Kinase bevorzugt in einer gestreckten Konformation gebunden (Abbildung 2.2 in Kapitel 2.1). Aufgrund dessen konnte die intramolekulare pY527-Sequenz, die die Src-Kinase inaktiviert, nicht durch den Duplex aus dem PNA-Peptid-PNA-Konjugat **9** und der **DNA1** verdrängt werden. Der Strangaustausch der **DNA1** durch die **RNA1** hobte die erzwungene Krümmung der Peptidkonformation auf und erlaubte eine Bindung an die Src SH2-Domäne. Daraus resultierte eine Reorganisation der gesamten Proteinstruktur, wodurch im *in vitro*-Experiment bis zu 86 % der Kinaseaktivität regeneriert werden konnte. Dieser Ansatz der templatvermittelten Konformationssteuerung eröffnet eine Möglichkeit für den aktiven Eingriff in einen Signaltransduktionsmechanismus, der die Regulierung von Signalproteinen unter die Kontrolle von endogenen RNA-Molekülen stellen kann.

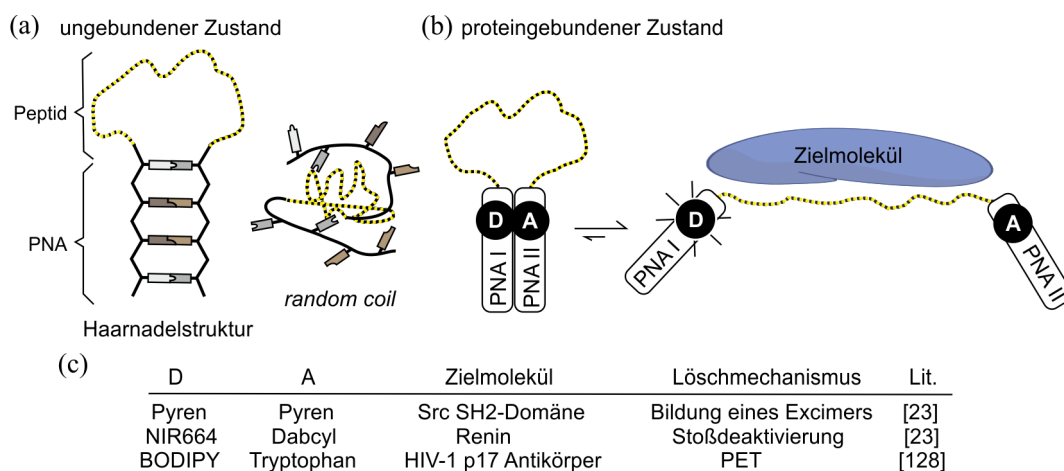
### 2.4.3 PNA-Peptid-Konjugate in der Proteindetektion

Die Interaktion mit speziell funktionalisierten PNA-Peptid-Konjugaten kann für die Detektion von Proteinen verwendet werden. Eine in der Literatur beschriebene Methode wurde z.B. für die Quantifizierung von Antikörpern entwickelt (Abbildung 2.23).<sup>[174]</sup> Sie beruhte auf der konzentrationsabhängigen Bildung eines ternären Komplexes **10** aus einem Antikörper, einem fluoreszenzmarkierten (**11**) und einem PNA-konjugierten Peptid-Epitop (**12**), die in ihrer Peptidsequenz übereinstimmen. Der Komplex **10** konnte aus dem Inkubationsmedium durch eine Immobilisierung an einer mit der komplementären PNA-Sequenz funktionalisierten Mikro-partikeloberfläche selektiv entfernt und ausgelesen werden. Als photolumineszente Markierung wurde ein Lanthanoid-Chelat-Komplex verwendet, der eine zeitverzögerte Fluoreszenzmessung mit einem minimierten Hintergrundsignal gestattete. Der Einsatz von diversen Peptid-PNA-Konjugaten erlaubte weiterhin die simultane Bestimmung mehrerer Antikörper über einen großen Konzentrationsbereich.



**Abbildung 2.23:** Konzept der Quantifizierung von Antikörpern mithilfe von PNA-Peptid-Konjugaten.<sup>[174]</sup>

Eine vollständig in homogener Lösung ablaufende Untersuchungsmethode für Proteine basiert auf der Verwendung von strukturierten Peptidsonden, den sogenannten *Hairpin Peptide Beacons* (HPBs) (Abbildung 2.24).<sup>[23,128]</sup> Die zentrale, peptidische Erkennungssequenz für das jeweilige Zielmolekül wird durch zwei PNA-Segmente (PNA I und PNA II) flankiert. Durch Variation der Länge und Sequenz der PNA I und II kann die Stabilität eines intramolekularen Duplexes gezielt eingestellt und somit die Strukturform des ungebundenen PNA-Peptid-Konjugats festgelegt werden (Abbildung 2.24 a). Mithilfe thermischer Denaturierungsexperimente



**Abbildung 2.24:** (a) Mögliche Strukturformen von PNA-Peptid-Konjugaten im ungebundenen Zustand. (b) Funktionsweise eines dualmarkierten HPBs am Beispiel der Bindung an ein Protein. (c) Anwendungsbeispiele von HPBs in der Proteindetektion.

können die Schmelztemperaturen der PNA-Peptid-Konjugate bestimmt und entsprechend ihrer Schmelzkurven in verschiedene Strukturformen unterteilt werden. Eine Haarnadelstruktur wird als stabil definiert, wenn der Anteil an geöffneter Form bei  $25^\circ\text{C} \leq 10\%$  ist. Die Konjugate mit nicht komplementären PNA-Segmenten weisen keinen Wendepunkt in der Schmelzkurve auf und liegen folglich, wie die Peptidson-

den, unstrukturiert als *random coil* vor. Die PNA-Segmente können je nach Bedarf, z. B. durch die Kupplung an Seitenketten zusätzlich eingeführter Aminosäuren, mit verschiedenen Chromophorenpaaren funktionalisiert werden, die bei einer stabilen Haarnadelstruktur infolge der erzwungenen Proximität effizient miteinander über diverse Energietransfermechanismen wechselwirken. Das zentrale Peptidsegment ist meist ein 8-15 Aminosäuren langer Ausschnitt aus einem interagierenden Protein und enthält die Erkennungssequenz für das Zielprotein, das untersucht werden soll. Es kann beliebig variiert werden, was eine universelle Anwendbarkeit in der Proteinuntersuchung gestattet. Die einzige Voraussetzung ist eine konformative Änderung infolge der Wechselwirkung mit dem Zielmolekül, die zu einer Öffnung der Haarnadelstruktur führt (Abbildung 2.24 b, am Beispiel einer reversiblen Bindung an ein Protein).

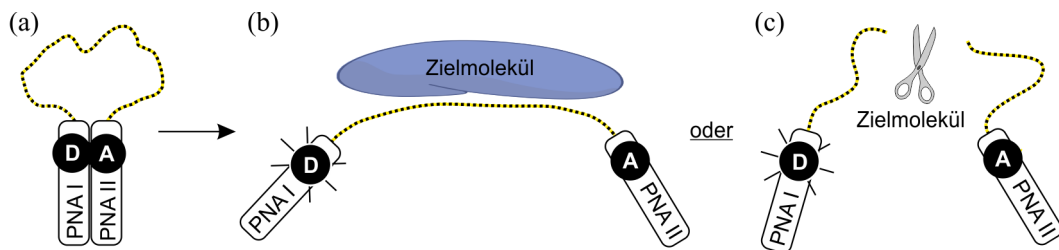
Die resultierende Separierung der Chromophore spiegelt sich in einer signifikanten Veränderung des Fluoreszenzspektrums der entsprechenden Sonde wider und wurde zur Detektion von Proteinen in homogener Lösung verwendet (Abbildung 2.24 c). Thurley *et al.* gelang beispielsweise die sensitive Detektion der Src SH2-Domäne unter Verwendung einer excimerbasierten Sondenmarkierung.<sup>[23]</sup> Die Pyreneinheiten wurden dabei über eine Amidbindung mit einer  $\varepsilon$ -Aminofunktion terminaler Lysine eingeführt. Sie erzielten einen 12-fachen Anstieg der Monomeremission infolge der Bindung an die Domäne, der um ein Vielfaches größer als der eines sequenzanalogen, unstrukturierten Peptids war. Weiterhin untersuchten sie die Aktivität der Protease Renin mithilfe einer mit dem Aminosäureanalogon Statin modifizierten und somit nicht spaltbaren Sonde, deren Löschmechanismus auf einer Stoßdeaktivierung basierte. Bei der quantitativen Bindung durch die Protease konnten sie einen 8-fachen Fluoreszenzanstieg des NIR-Farbstoffes messen. Oh *et al.* funktionalisierten ihre haarnadelförmige Struktur mit BODIPY und Tryptophan, wodurch der zugrundeliegende Löschmechanismus auf dem photoinduzierten Elektronentransfer (PET) beruhte.<sup>[128]</sup> Sie erreichten einen 3-fachen Signalanstieg bei der Detektion eines HIV-spezifischen Antikörpers.

Ein bedeutender Vorteil der haarnadelstrukturierten PNA-Peptid-Konjugate gegenüber unstrukturierten, sequenzanalogen Peptidsonden ist das wesentlich geringere Hintergrundsignal. Aufgrund der Haarnadelstruktur wird die Löscheffizienz der Donoremmission infolge der erzwungenen Proximität zum Akzeptorchromophor im ungebundenen Zustand erheblich gesteigert. Dies ermöglicht eine höhere Responsivität bei der Wechselwirkung mit dem Zielmolekül.



### 3 Zielsetzung

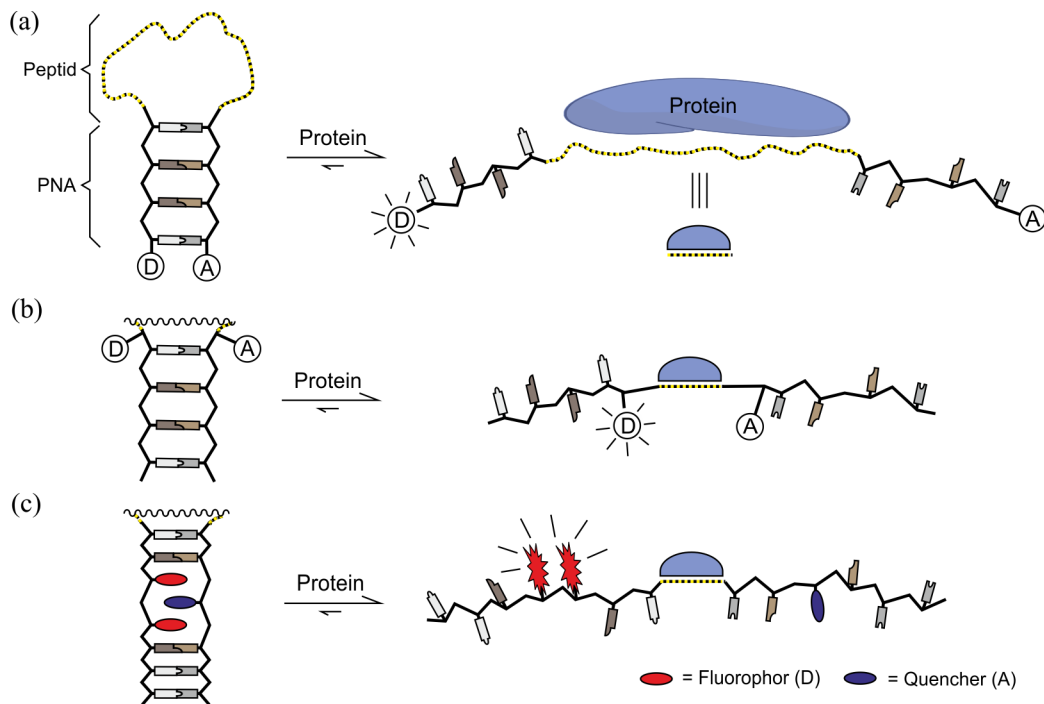
Die Untersuchung von Proteinen und Proteaseaktivitäten mit signalgebenden Sonden kann für die Quantifizierung von relevanten Proteinen in der Diagnostik von Krankheiten eingesetzt werden. Für eine Anwendung in einem homogenen Verfahren ist es essentiell, sensitive Sonden zu generieren, die eine spezifische und direkte Detektion kleinster Konzentrationen des Zielmoleküls im nM-Bereich in der komplexen Umgebung der Zelle oder der extrazellulären Matrix erlauben. Mit den haarnadelstrukturierten, dualmarkierten PNA-Peptid-Konjugaten wurde ein Sondentyp entwickelt, der durch den Austausch der zentralen, peptidischen Erkennungssequenz universell einsetzbar ist und eine sensitive Detektion der Zielmoleküle erlauben sollte (Abbildung 3.1 a).<sup>[23]</sup> Die Bildung einer doppelhelikalen PNA-Stammregion



**Abbildung 3.1:** Detektionsprinzip von haarnadelstrukturierten, dualmarkierten PNA-Peptid-Konjugaten. (a) Allgemeine Struktur im ungebundenen Zustand. Anstieg der Donoremission durch: (b) Rigidisierung infolge der Bindung an ein Protein oder (c) hydrolytische Spaltung durch eine Protease. D = Donor, A = Akzeptor.

aus den komplementären, flankierenden PNA-Sequenzen gewährleistet eine effiziente Energieübertragung zwischen dem Donorfluorophor im *N*-terminalen PNA-Segment (PNA I) und dem Akzeptorchromophor im *C*-terminalen PNA-Segment (PNA II) im ungebundenen Zustand, wodurch das Hintergrundsignal der Sonde minimiert wird. Bei Anwesenheit des Zielmoleküls steigt die Donoremission infolge einer Separierung vom Akzeptorchromophor in Echtzeit an (Abbildung 3.1 b, c). Dieser Anstieg ist proportional zur vorhandenen Proteinkonzentration oder Proteaseaktivität. Die Öffnung der Haarnadel wird dabei durch (b) die Bindung an oder (c) die Spaltung durch das Zielmolekül verursacht.

Bisherige Signalverstärkungen der terminal markierten *Hairpin Peptide Beacons* (Abbildung 3.2 a) lagen weit unter denen von strukturanalogen DNA-basierten Sonden, die in der Untersuchung von Nukleinsäuren eingesetzt werden.<sup>[24–26]</sup> Ziel dieser Arbeit war daher, eine neue Art der Markierung für die PNA-Peptid-Konjugate zu entwickeln, die eine geringe Hintergrundfluoreszenz im geschlossenen Zustand und eine gesteigerte Signalintensität in Anwesenheit des Zielmoleküls aufweist. Für die Erhöhung der Responsivität sollten zwei Ansätze verfolgt werden. Zum einen sollte eine sequenzinterne Markierung vorgenommen werden, bei der die Signalmoleküle näher an der Bindungstasche des Proteins lokalisiert sind (Abbildung 3.2 b). Infolgedessen würde die eingeschränkte Flexibilität der Chromophore zu einem reduzierten Energietransfer im gebundenen Zustand und somit zu einer Signalverstärkung beitragen. Zum anderen sollte, inspiriert durch den *In-Stem Molecular Beacon*,<sup>[175]</sup> ein neuartiges Sondendesign für die Proteinuntersuchung eingeführt werden, bei dem die Fluorophore als Pseudonukleobasen in der PNA-Stammregion positioniert sind (Abbildung 3.2 c). Die Verwendung von Fluorophoren wie Pyren, die im angeregten Zustand Excimere bilden können, gestattet die direkte Analyse in komplexen, biologischen Medien unter Verwendung von zeitaufgelösten Methoden. Dadurch wäre eine Detektion ohne Probenvorbereitung möglich, die einen schnellen Probendurchsatz in



**Abbildung 3.2:** Detektionsprinzip der (a) terminal, (b) sequenzintern und (c) stammin-tern markierten, haarnadelförmigen PNA-Peptid-Konjugate.

---

der Anwendung erlaubt. Als Modellsysteme für die *in vitro*-Untersuchungen in Puffer sollten die intrazellulären SH2-Domänen der Src- und Lck-Kinase sowie die extrazelluläre Matrix-Metalloprotease 7 fungieren. Des Weiteren sollte unter Verwendung der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung eine geringe Konzentration im einstelligen nM-Bereich von MMP-7 in komplexen, biologischen Medien, wie DMEM\* oder Humanserum, detektiert werden.

Für DNA-basierte *Molecular Beacons* konnte eine höhere Spezifität gegenüber dem Nukleinsäure-Target, im Vergleich zu unstrukturierten Hybridisierungs sonden, nachgewiesen werden.<sup>[176]</sup> Mithilfe thermodynamischer Untersuchungen unmarkierter PNA-Peptid-Konjugate verschiedener Haarnadelstabilität sollte überprüft werden, ob dieser Sachverhalt auch auf peptidbasierte Haarnadelstrukturen übertragbar ist. Unter Verwendung der Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) sollten dafür erste thermodynamische Daten der Bindung der PNA-Peptid-Konjugate an die beiden nah verwandten SH2-Domänen der Src- und Lck-Kinase erhoben werden. Dabei könnten zusätzlich Erkenntnisse gewonnen werden, die zum Verständnis der thermodynamischen Triebkraft der Bindung der PNA-Peptid-Konjugate an eine Proteindomäne beitragen. Des Weiteren könnten durch die Auswertung der thermodynamischen Daten Hinweise zu dem Einfluss der PNA-Segmente bzw. der Strukturierung der PNA-Peptid-Konjugate auf den Bindungsprozess gewonnen werden.



## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Strategien und Optimierung der PNA-Peptid-Konjugatsynthese

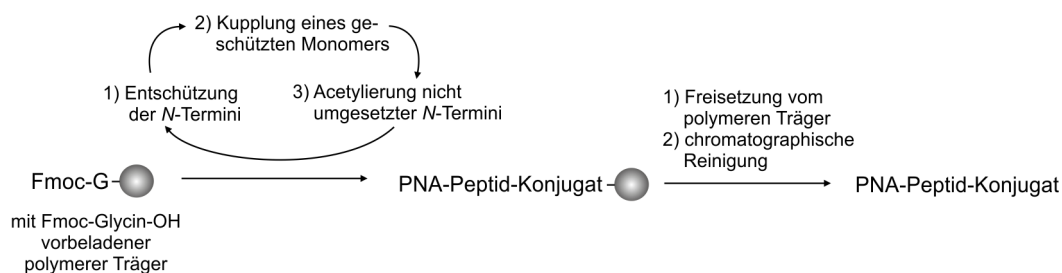
In Tabelle 4.1 sind die zentralen Peptidsequenzen, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, mit den dazugehörigen Zielproteinen und Anwendungsgebieten aufgelistet.

**Tabelle 4.1:** Verwendete Peptidsequenzen mit Zielproteinen und Anwendungsgebieten.

Sequenz	Zielprotein	Verwendung
PQpYEEIPI	Src- und Lck SH2-Domänen	ITC, sequenz- und stamminterne Fluoreszenzmarkierung
TEGQpYQPQP	Src- und Lck SH2-Domänen	ITC
RPLA LWRS	MMP-7	stamminterne Fluoreszenzmarkierung

Die Erkennungsmotive der SH2-Domänen sind unterstrichen. Die Spaltposition der Protease ist durch einen senkrechten Strich gekennzeichnet.

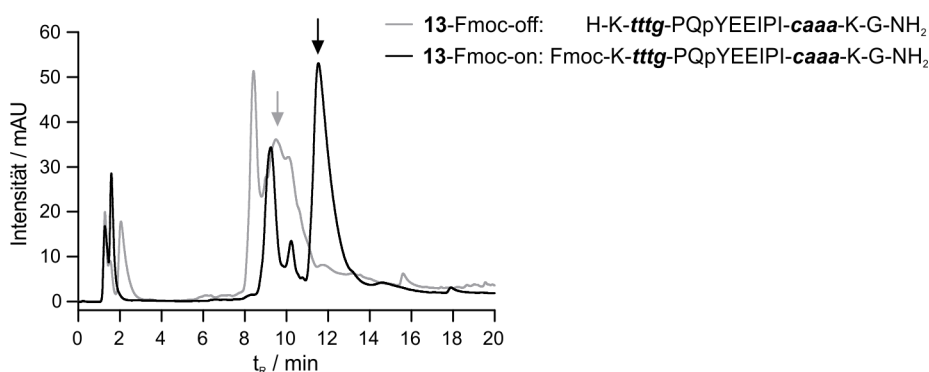
Die Synthese der unterschiedlichen PNA-Peptid-Konjugate (unmarkiert, sequenz- und stammintern markiert) erfolgte stets mithilfe einer linearen Festphasensynthese nach der in Abbildung 4.1 dargestellten Methodik unter Verwendung kommerziell erhältlicher Aminosäuren und PNA-Monomere oder zuvor selbst synthetisierter Modifikationen (Kapitel 4.1.3). Der polymere Träger wurde zunächst mit Fmoc-Glycin-OH umgesetzt, um die Beladung einzustellen und einen Bezugspunkt für die Ausbeuteberechnung nach vollendeter Aufreinigung zu erhalten. Der Aufbau der Oligo-



**Abbildung 4.1:** Allgemeine Methodik zur Herstellung von PNA-Peptid-Konjugaten.

mere erfolgte durch sich wiederholende Zyklen aus 1) Entschützung der *N*-Termini, 2) Kupplung eines Monomers entsprechend der Sequenz und 3) Acetylierung nicht umgesetzter *N*-Termini mit einem Essigsäureanhydrid/2,6-Lutidin/DMF-Gemisch. Zur Aktivierung der Monomere wurden, neben der nicht nukleophilen Base NMM, entweder Uroniumsalze, wie HCTU und HBTU, oder das Phosphoniumsalz PyBOP verwendet. Um eine Racemerisierung bei den Aminosäurekupplungen zu vermeiden, wurde HOBt in äquimolaren Mengen zugefügt. Automatisierte Synthesen wurden unter Verwendung von HCTU bzw. HBTU, aufgrund der längeren Stabilität der Lösungen im Vergleich zu PyBOP, durchgeführt. Die Besonderheiten der einzelnen Syntheserouten werden in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

Die Retentionszeiten der Abbruch- und Zielsequenzen unterschieden sich nach der Endabspaltung vom polymeren Träger nicht ausreichend für eine Basislinientrennung in der chromatographischen Aufreinigung, was eine Isolierung der reinen Verbindung unmöglich machte (**13**-Fmoc-off in Abbildung 4.2). Die *N*-terminale Fmoc-



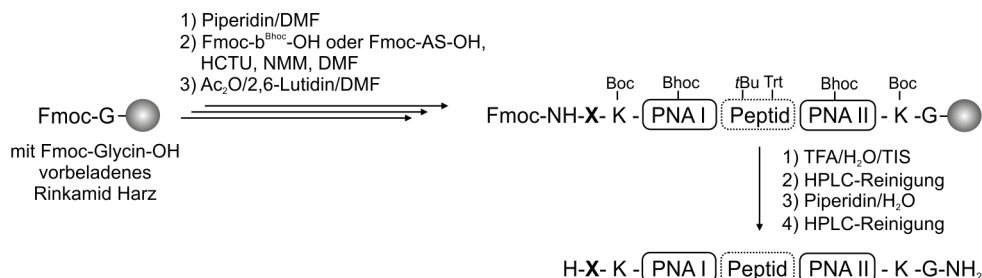
**Abbildung 4.2:** HPLC-Spuren der Rohprodukte von **13** mit und ohne terminale Fmoc-Schutzgruppe (3→70 % B in 20 min, 260 nm). Der Pfeil zeigt jeweils die Zielsequenz an.

Schutzgruppe verursachte eine Verschiebung der Retentionszeiten von 2-3 Minuten, die eine Separierung von den Nebenprodukten im Laufe der chromatographischen Aufreinigung ermöglichte (**13**-Fmoc-on in Abbildung 4.2). Sie wurde folglich als hydrophober *Tag* verwendet. Dies erforderte jedoch nach der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe in Lösung mit einem Piperidin:H<sub>2</sub>O-Gemisch einen zusätzlichen chromatographischen Reinigungsschritt, was mit einem Ausbeuteverlust verbunden war.

#### 4.1.1 Synthese unmarkierter PNA-Peptid-Konjugate

Für die thermodynamische Untersuchung mithilfe der Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) wurden unmarkierte PNA-Peptid-Konjugate mit dem zentralen SH2-

spezifischen Peptid P<sub>Qp</sub>YEEIPI und variierenden PNA-Sequenzen unter Verwendung der Fmoc-basierten Festphasensynthese nach Abbildung 4.3 automatisiert hergestellt. Die terminalen Lysin-Monomere wurden verwendet, um die Löslichkeit



**Abbildung 4.3:** Synthese unmarkierter PNA-Peptid-Konjugate. **X** = *N*-terminale Modifikation bestehend aus Aspartateinheiten.

zu erhöhen. Bei einer angestrebten Konzentration im niedrigen mM-Bereich war jedoch nur eine geringe Löslichkeit für die Sonde **14** (13 %) und **13** (24 %) im neutralen HEPES-Puffer gegeben (Tabelle 4.2). Durch Variation der Pufferzusammensetzung und Einführung von Detergenzien, wie CHAPS oder Triton X-100, konnte die Löslichkeit nicht signifikant gesteigert werden. Aufgrund dessen wurde der *N*-Terminus der Konjugate mit zusätzlichen und Aspartat-Resten modifiziert. Erst die Elongation mit mindestens zwei *N*-terminalen Aspartat-Resten resultierte bei sämtlichen PNA-Peptid-Konjugaten verschiedener Haarnadelstabilität in einer

**Tabelle 4.2:** Übersicht der unmarkierten PNA-Peptid-Konjugate mit pYEEI-Motiv.

	Sequenz			Ausbeute [%]	Löslichkeit [%]*
	(H-X-K-PNA I-PQpYEEIPI-PNA II-K-G-NH <sub>2</sub> )				
	X	PNA I	PNA II		
<b>14</b>	-			26	13
<b>15</b>	D			9	42
<b>16</b>	DD	gttg	caac	7	100
<b>17</b>	DDD			10	100
<b>13</b>	-			21	24
<b>18</b>	DD	tttg	caaa	14	100
<b>19</b>	DDD			14	100
<b>20</b>	-			25	100
<b>21</b>	DD	gcta	ccaa	28	100
<b>22</b>	DDD			18	100

\* Prozentuale Löslichkeit in Puffer = Quotient aus realer Konzentration im Überstand und gewünschter Konzentration (z. B. 2 mM) mit 100 multipliziert. 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β-ME, pH 7.5.

Löslichkeit von 100 % im gewünschten mM-Bereich unter Verwendung des neutralen HEPES-Puffers ohne Detergenzienzusatz (Tabelle 4.2). Auffällig war, dass die unstrukturierte Sonde **20** bereits ohne Modifikation eine 100-prozentige Löslichkeit aufwies. Sämtliche Konjugate besaßen denselben Anteil an Purin-, Pyrimidinbasen und Aminosäuren, was somit nicht löslichkeitsbestimmend sein konnte. Die Ursache lag vermutlich in der unterschiedlichen Fähigkeit der PNA-Peptid-Konjugate im wässrigen Puffer Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen. Die Nukleobasen der PNA-Segmente lagen bei der unstrukturierten Sonde **20** vollständig ungepaart vor, wodurch ihre funktionellen Gruppen für nichtkovalente Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel zur Verfügung standen und die 100-prozentige Löslichkeit bedingten. Die Amino- und Carbonylfunktionen der Nukleobasen der haarnadelstrukturierten Sonde **14** waren hingegen vollständig in die Hybridisierung mit dem komplementären PNA-Segment involviert, was zu einer verminderten Löslichkeit beiträgt. Das PNA-Peptid-Konjugat **13** bildete einen Mischfall, da bei Raumtemperatur bereits ein Anteil im geöffneten Zustand vorlag. Mit der Einführung *N*-terminaler Aspartate wurde eine Erhöhung der Ladung der Sonden erreicht, was einen Anstieg der Solvatisierbarkeit und somit der Löslichkeit nach sich zog.

Für nachfolgende Arbeiten wurde die Modifikation mit zwei *N*-terminalen Aspartaten gewählt, da eine vollständige Löslichkeit bei geringem synthetischen Aufwand erzielt werden konnte. Es wurden weitere Konjugate mit dem zweiten Bindungsmotiv pYPQPQ in analoger Weise synthetisiert (Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3:** Übersicht der unmarkierten PNA-Peptid-Konjugate mit pYPQPQ-Motiv.

	Sequenz		Ausbeute [%]
	<i>PNA I</i>	<i>PNA II</i>	
	(H-DD-K- <i>PNA I</i> -TEGQpYQPQP- <i>PNA II</i> -K-G-NH <sub>2</sub> )		
<b>23</b>	gttg	caac	16
<b>24</b>	tttg	caaa	24
<b>25</b>	gcta	ccaa	10

Darüber hinaus wurden PNA-Peptid-Konjugate mit nur einem PNA-Segment ausgehend von dem pYEEI-Bindungsmotiv hergestellt, um in späteren ITC-Untersuchungen den Einfluss der PNA-Segmente auf das Bindungsverhalten zu klären (Tabelle 4.4).



**Tabelle 4.4:** Übersicht der unmarkierten PNA-Peptid-Konjugate mit pYEEI-Motiv und nur einem PNA-Segment.

	Sequenz		Ausbeute [%]
	(H-DD-K- <i>PNA I</i> -PQpYEEIPI- <i>PNA II</i> -K-G-NH <sub>2</sub> )		
	<i>PNA I</i>	<i>PNA II</i>	
<b>26</b>	gttg		19
<b>27</b>	tttg	-	30
<b>28</b>	gcta		22
<b>29</b>		caac	18
<b>30</b>	-	caaa	17
<b>31</b>		ccaa	13

Es wurden zusätzlich die jeweiligen Peptidsequenzen in einer Fmoc-basierten, automatisierten Festphasensynthese hergestellt, um deren Ergebnisse in Relation zu denen der PNA-Peptid-Konjugate zu setzen (Tabelle 4.5). Im Gegensatz zu den PNA-Peptid-Konjugaten war eine Verwendung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe als hydrophober *Tag* nicht notwendig. Der *N*-Terminus der Peptidsequenz wurde nach Beendigung der Synthese am polymeren Träger freigesetzt und acetyliert.

**Tabelle 4.5:** Übersicht der hergestellten, unmarkierten Peptide.

	Sequenz	Ausbeute [%]
<b>32</b>	Ac-PQpYEEIPI-NH <sub>2</sub>	19
<b>33</b>	Ac-TEGQpYQPQP-NH <sub>2</sub>	21

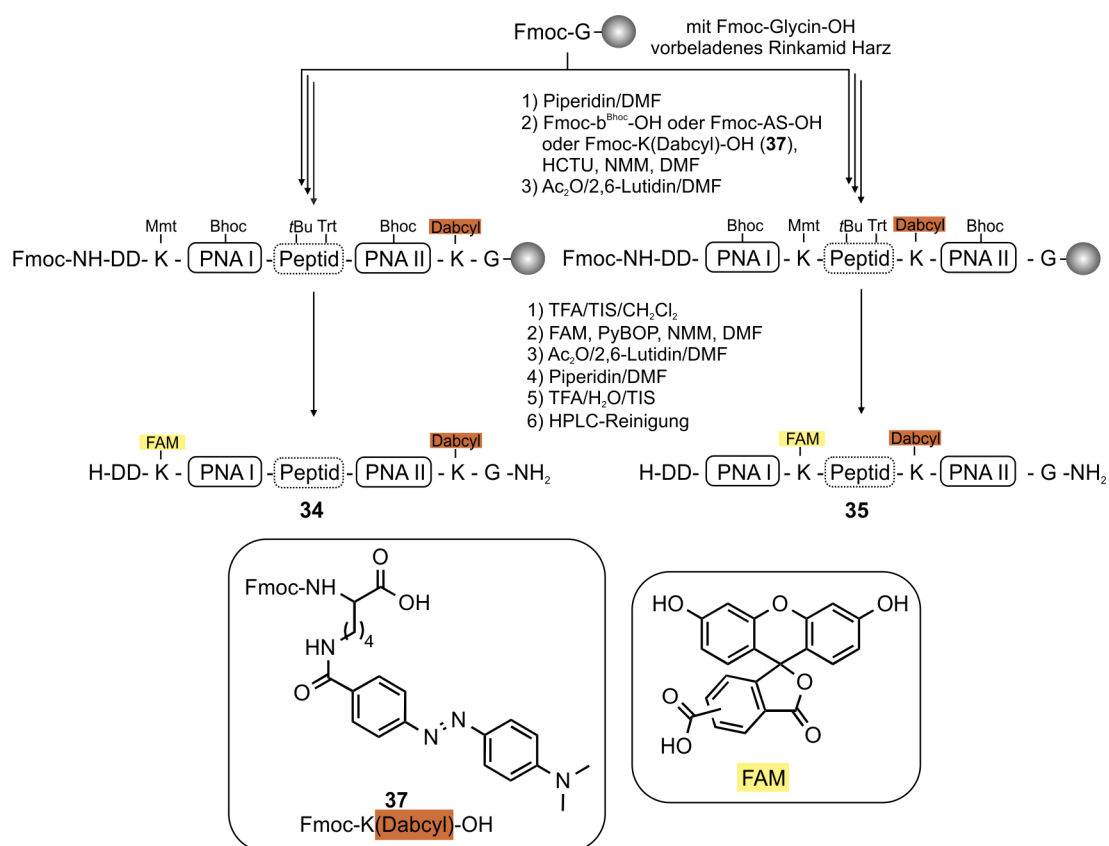
#### 4.1.2 Synthese von FAM/Dabcyl-markierten PNA-Peptid-Konjugaten

Das zentrale Peptidsegment des terminal (**34**) und sequenzintern (**35**) markierten PNA-Peptid-Konjugats, als auch der entsprechenden Peptidsonde **36** für die Evaluation der alternativen Markierungsmethode entsprach der Peptidsequenz PQpYEEIPI, die spezifisch von SH2-Domänen gebunden wird (Tabelle 4.6). Diese wurde im Falle der PNA-Peptid-Konjugate **34** und **35** mit flankierenden komplementären PNA-Segmenten versehen, die die quantitative Bildung einer Haarnadelstruktur gewährleisteten. Die Chromophore FAM und Dabcyl wurden über eine Amidbindung mit der  $\epsilon$ -Aminofunktion von Lysineinheiten in die Sequenz eingeführt. Der aus Kapitel 4.1.1 bekannte positive Effekt von zwei *N*-terminalen Aspartateinheiten auf

**Tabelle 4.6:** Übersicht der Sonden zur Evaluation der sequenzinternen Markierung.

	Sequenz		Ausbeute [%]
	(H-DD- <i>PNA I</i> -PQpYEEIPI- <i>PNA II</i> -G-NH <sub>2</sub> )		
	<i>PNA I</i>	<i>PNA II</i>	
<b>34</b>	K(FAM)-gttg	caac-K(Dabcyl)	13
<b>35</b>	gttg-K(FAM)	K(Dabcyl)-caac	20
<b>36</b>	H-K(FAM)-PQpYEEIPI-K(Dabcyl)-NH <sub>2</sub>		22

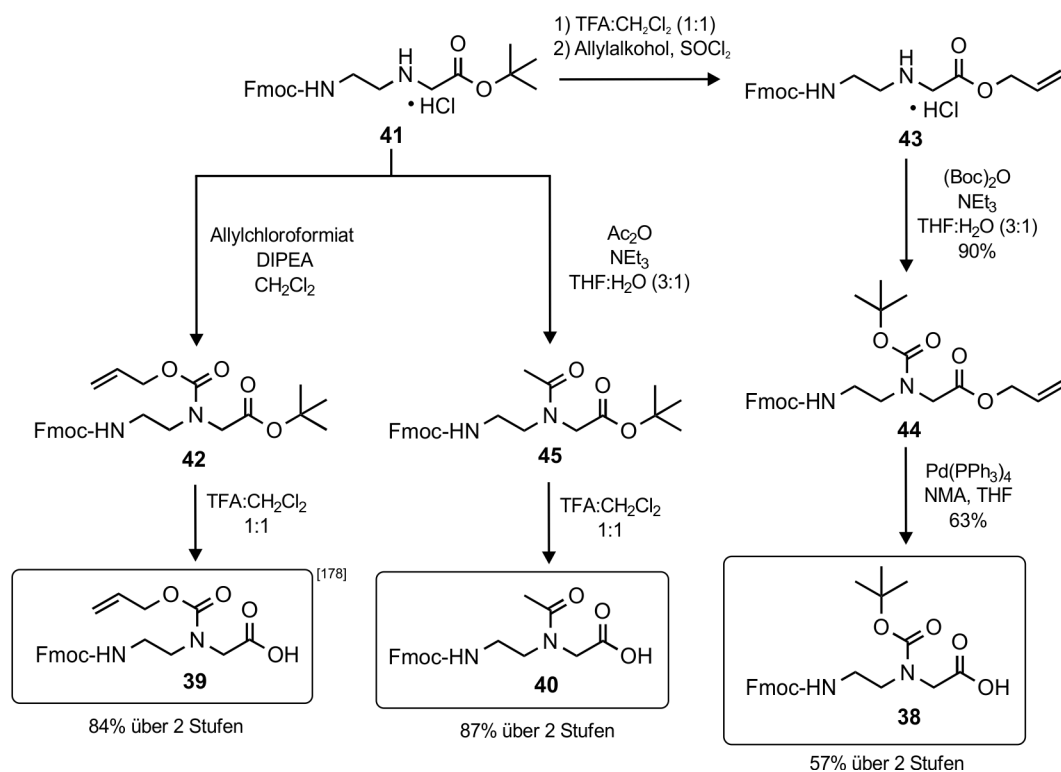
die Löslichkeit wurde auch bei diesem Sondentyp verwendet, da ein Anstieg der Hydrophobizität infolge der Chromophoreinführung erwartet wurde. Die Herstellung der PNA-Peptid-Konjugate sowie der Peptidsonde erfolgte mithilfe automatisierter, Fmoc-basierter Festphasensynthese an einem Rinkamid-Harz (Abbildung 4.4). Der Fluoreszenzakzeptor Dabcyl wurde über ein zuvor im Arbeitskreis synthetisiertes Monomer (Fmoc-K(Dabcyl)-OH, **37**) im Laufe der automatisierten Synthese

**Abbildung 4.4:** Synthese der FAM/Dabcyl-markierten PNA-Peptid-Konjugate mit terminaler (links, **34**) und sequenzinterner Markierung (rechts, **35**). In den Boxen sind die Strukturen der verwendeten Chromophorbausteine dargestellt.

auf der *C*-terminalen Seite des Peptids eingebaut. Im Gegensatz dazu wurde der Fluoreszenzdonor FAM nach Synthese der Volllängensequenz durch manuelle Kupplung eingeführt. Dafür wurde zunächst kommerziell erhältliches Fmoc-K(Mmt)-OH *N*-terminal zum Peptidsegment in die Sequenz eingebaut. Durch die Behandlung des Harzes mit einer 2-prozentigen TFA-Lösung in Dichlormethan und dem Zusatz von 5 % Triisopropylsilan (TIS) als Kationenfänger konnte die Mmt-Schutzgruppe selektiv entfernt werden, was die Kupplung von FAM an die freie  $\varepsilon$ -Aminofunktion des Lysins gestattete. Die Anwendung der Fmoc-on/off-Strategie zur Reinigung der Zielverbindungen war in diesem Fall nicht möglich, da die Mehrfachester von FAM, die bei dessen Kupplung entstanden, durch die Behandlung mit einem Piperidin/DMF-Gemisch vor der Freisetzung vom polymeren Träger entfernt werden mussten. Es gelang in diesem Fall dennoch die Abbruchsequenzen durch chromatographische Reinigung abzutrennen.

### 4.1.3 Synthese von modifizierten PNA-Monomeren

Der Aufbau der neuen PNA-Peptid-Konjugate mit stamminthener Fluoreszenzmarkierung, der sogenannten *In-Stem Hairpin Beacons* (*IS-HPBs*), erforderte die Herstellung des Boc- (**38**) und Alloc-geschützten PNA-Monomers (**39**) (Abbildung 4.5), die die Einführung der Chromophore an fester Phase erlaubten. Zusätzlich wurde ein abasisches PNA-Monomer (**40**) synthetisiert, das als *Spacer* (**S**) komplementär zum Fluorophor (**F**) und Quencher (**Q**) in einer reißverschlussartigen Anordnung in die PNA-Stammregion eingebaut werden konnte. Dadurch sollten mögliche Störungen der Basenstapelung aufgrund des erhöhten sterischen Anspruchs der Pseudonukleobasen vermindert und somit eine extrahelikale Anordnung der Chromophore vermieden werden. Ausgehend von dem geschützten PNA-Rückgrat **41**, dessen Synthese in der Arbeitsgruppe Seitz bereits etabliert war,<sup>[177]</sup> erfolgte die Herstellung des *tert*-Butylesters **42** durch die Umsetzung mit Allylchloroformiat unter basischen Bedingungen nach einer Literaturvorschrift von Jarikote *et al.*<sup>[178]</sup> Durch die anschließende Behandlung mit einer 50-prozentigen TFA-Lösung in Dichlormethan wurde die *tert*-Butyl-Schutzgruppe abgespalten und die Carboxyl-Funktion für den Einsatz in der Festphasensynthese freigesetzt. Das PNA-Monomer **39** konnte über eine Fällung aus einer Ethylacetat/Cyclohexan-Mischung gewonnen werden. Die Herstellung des Boc-Monomers **38** verlangte zunächst die Überführung des *tert*-Butylesters **41** in den Allylester **43**.<sup>[179]</sup> Die, durch eine Synthesevorschrift von Horiuchi *et al.* inspirierte, Kupplung einer Boc- bzw. Acetyl-Funktion an das



**Abbildung 4.5:** Synthese der modifizierten PNA-Monomere für die Festphasensynthese.

sekundäre Amin des PNA-Rückgrats unter Bildung der Verbindungen **44** bzw. **45** erfolgte unter Verwendung der entsprechenden Anhydride und dem Zusatz einer Base. Die Allyl-Schutzgruppe von Verbindung **44** wurde Pd-katalysiert unter Verwendung des nukleophilen Allylfängers N-Methylanilin entfernt. Die Carboxylfunktion der Verbindung **45** wurde durch die Behandlung mit einer 50-prozentigen TFA-Lösung in Dichlormethan freigesetzt. Für die Isolierung der Monomere **38** und **40** war eine säulenchromatographische Reinigung erforderlich.

Die Schutzgruppen der sekundären Aminofunktion des synthetisierten Boc- (**38**) und Alloc-geschützten PNA-Monomers (**39**) waren chemisch resistent gegenüber den üblichen Bedingungen der Festphasensynthese und ließen sich selektiv bei Bedarf freisetzen. Die modifizierten PNA-Monomere konnten in moderaten Ausbeuten (57-87 %) für den Einsatz in der Festphasensynthese erhalten werden. Die reduzierte Ausbeute des Monomers **38** (57 % über 2 Stufen) resultierte aus der mehrmaligen säulenchromatographischen Reinigung und der Korrektur der Ausbeute anhand des Anteils der Verunreinigung Triphenylphosphan bzw. Triphenylphosphinoxid.

#### 4.1.4 Synthese der PNA-Peptid-Konjugate mit stamm-interner Fluoreszenzmarkierung

Das neue Sondendesign der *IS-HPBs* sollte anhand von zwei verschiedenen, zentralen Peptidsequenzen untersucht werden. Zum einen diente die bereits bekannte Peptidsequenz PQpYEEIPI als zentrales Element, das spezifisch von den SH2-Domänen der Src- und Lck-Kinase gebunden wird. Zum anderen wurde das Peptid RPLALWRS verwendet, das durch die Matrix-Metalloprotease 7 (MMP-7) erkannt und selektiv zwischen der Ala-Leu-Bindung proteolytisch gespalten wird. Die Optimierung der Synthese erfolgte überwiegend anhand der Sonden, die spezifisch an die SH2-Domänen binden.

Die Schutzgruppenchemie des synthetisierten Boc-Monomers **38** verlangte eine Variation der bisher durchgeführten Festphasensynthese. Die Abspaltbedingungen für die Boc-Schutzgruppe zur Freisetzung der sekundären Aminofunktion waren inkompatibel mit der Bhoc-Schutzgruppe der exozyklischen Aminofunktion der kommerziell erhältlichen Fmoc-geschützten PNA-Monomere, die in der Fmoc-basierten Strategie seither eingesetzt wurden. Aufgrund dessen erfolgte die Herstellung der markierten Konjugate unter Verwendung sowohl der Boc-, als auch der Fmoc-basierten Synthesestrategie, dessen Ablauf in Abbildung 4.6 illustriert ist. Es wurde ein MBHA-Harz verwendet, das gegenüber der Behandlung mit TFA stabil ist und die Freisetzung der Oligomere vom polymeren Träger nur unter Zusatz der Supersäure TFMSA zulässt. Beim manuellen Aufbau des ersten PNA-Segments bis zur Position des Boc-geschützten Monomers **38** wurde die Boc/Z-Strategie verwendet. Die exozyklische Z-Schutzgruppe der PNA-Monomere ermöglichte eine selektive Freisetzung der sekundären Aminofunktion des Monomers **38**, an das die kommerziell erhältliche Anthrachinon-2-carbonsäure unter Bildung des Quencher-Bausteins **Q** gekuppelt wurde. Die Elongation der Sequenzen mit weiteren PNA-Monomeren, u. a. mit dem Alloc-geschützten PNA-Monomer **39** und dem *Spacer* **40** (**S**), sowie Aminosäuren wurde unter Verwendung einer Fmoc-basierten Synthesestrategie automatisiert fortgesetzt. Die Kupplung des Fluorophors an das Volllängenprodukt wurde manuell mit der entsprechenden Pyrenecarbonsäure nach der Pd-katalysierten Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe unter Bildung des Fluorophor-Bausteins **F** (**P2** mit 1-Pyrenessigsäure oder **P4** mit 1-Pyrenbuttersäure, Abbildung 4.7 a) ausgeführt. Die Freisetzung vom polymeren Träger sowie die Entschützung der Seitenketten und exozyklischen Funktionen erfolgte unter Verwendung stark saurer Bedingungen mit dem Einsatz eines TFA:TFMSA:*m*-Kresol-Gemisches. Analog zu vorherigen

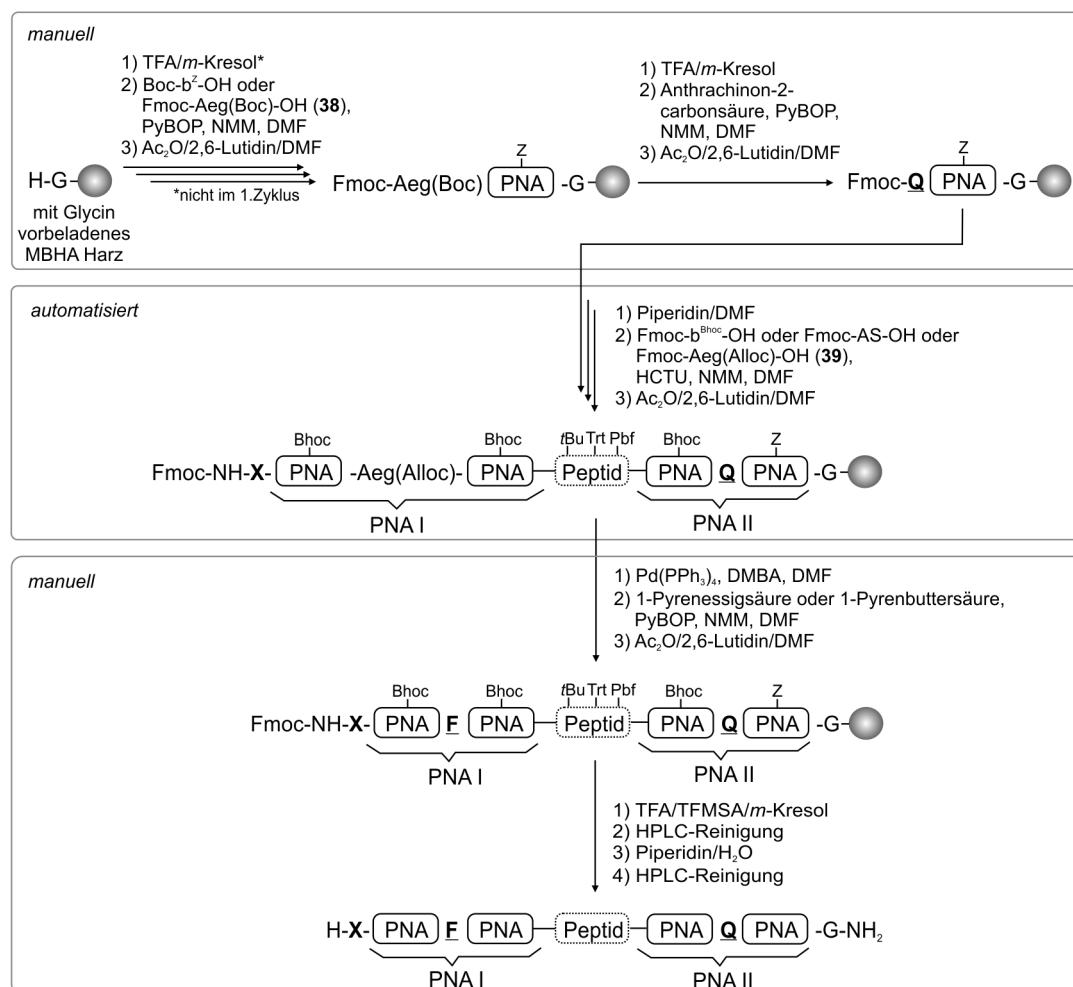
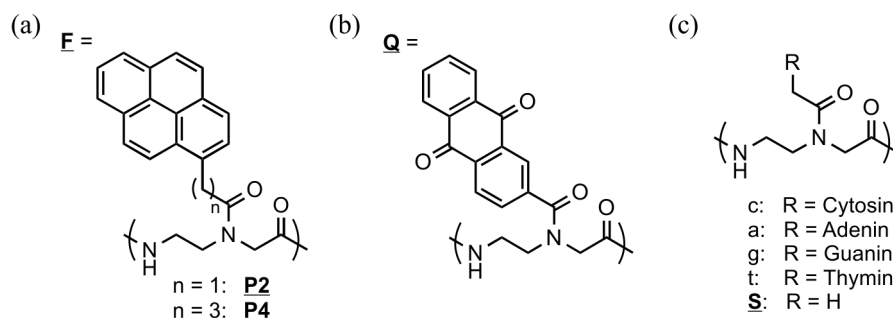


Abbildung 4.6: Syntheseschema von IS-HPBs.

Synthesen wurde bei der Aufreinigung der Rohprodukte die *N*-terminale Fmoc-Funktion als hydrophober *Tag* zur Separierung von den Abbruchsequenzen verwendet. Nach der chromatographischen Reinigung des Fmoc-geschützten Produkts erfolgte die Entschützung des *N*-Terminus mithilfe einer Piperidin:H<sub>2</sub>O-Lösung, gefolgt von einer weiteren chromatographischen Reinigung.

Zu Beginn war nicht bekannt inwieweit die peptidbasierten Sonden mit der stamminernen Modifikation zu einer effektiven Basenstapelwechselwirkung in der Lage sein werden. Es wurden somit zahlreiche PNA-Peptid-Konjugate aus den PNA-Monomeren in Abbildung 4.7 hergestellt (Tabelle 4.7). Ziel war es, eine bei 25 °C stabile Haarnadelstruktur zu generieren, die zusätzlich einen hohen Signalanstieg bei der Detektion des Zielmoleküls aufweist. Es wurde sowohl die Länge und Sequenz der flankierenden PNA-Segmente, als auch die Anzahl an Fluorophor- und Quenchereinheiten variiert. Die Anbindung des Fluorophors erfolgte über zwei unter-



**Abbildung 4.7:** Strukturen der PNA-Monomere in den *IS-HPBs*: (a) Fluorophor-Baustein **F**, (b) Quencher-Baustein **Q** und (c) kommerzielle Monomere und *Spacer* **S**.

schiedlich lange Linker (Abbildung 4.7 a). Zusätzlich wurde der Einsatz eines *Spacers* (**S**) getestet, der in einer reißverschlussartigen Anordnung den Chromophoren mehr Raum für die Basenpaarung eröffnen und die Stabilität der Haarnadelstruktur steigern sollte. Bei den MMP-7 spezifischen Sonden wurde weiterhin die Flexibilität des Peptidsegments durch die Einführung von Linkern, wie Amino-hexansäure (Ahex) oder  $\beta$ -Alanin erhöht.

**Tabelle 4.7:** Übersicht der PNA-Peptid-Konjugate mit stamminthener Fluoreszenzmarkierung und Peptidsonden.

Sequenz (H-X- <i>PNA I</i> -Peptid- <i>PNA II</i> -G-NH <sub>2</sub> )			Ausbeute [%]	
X	<i>PNA I</i>	<i>PNA II</i>		
Peptid = PQpYEEIPI				
46	g- <u>P2</u> -S-g	c- <u>Q</u> -S-c	< 1	
47	g- <u>P2</u> -g	c- <u>Q</u> -c	14	
48	t- <u>P2</u> -g	c- <u>Q</u> -a	28	
49	-	t- <u>P2</u> -t	a- <u>Q</u> -a	15
50	g- <u>P4</u> -g	c- <u>Q</u> -c	2	
51	t- <u>P4</u> -g	c- <u>Q</u> -a	10	
52	t- <u>P4</u> -t	a- <u>Q</u> -a	9	
53	gg- <u>P2</u> -g	c- <u>Q</u> -cc	< 1	
54	-	g- <u>P2</u> -gg	cc- <u>Q</u> -c	4
55	g- <u>P4</u> -gg	cc- <u>Q</u> -c	9	
56	ga- <u>P2</u> -ag	ct- <u>Q</u> -tc	1	
57	ga- <u>P4</u> -ag	ct- <u>Q</u> -tc	< 1	
58	gg- <u>P2</u> -gg	cc- <u>Q</u> -cc	3	
59	-	cc- <u>P2</u> -cc	gg- <u>Q</u> -gg	8
60	tg- <u>P2</u> -gg	cc- <u>Q</u> -ca	4	
61	tg- <u>P4</u> -gg	cc- <u>Q</u> -ca	2	

Ahex = Amino-hexansäure;  $\beta$ A =  $\beta$ -Alanin; **P2**, **P4** = Fluorophor; **Q** = Quencher; **S** = *Spacer*.

Sequenz (H-X- <i>PNA I</i> -Peptid- <i>PNA II</i> -G-NH <sub>2</sub> )			Ausbeute [%]
X	<i>PNA I</i>	<i>PNA II</i>	
62	cca- <b>P2</b> -ac	gt- <b>Q</b> -tgg	5
63	cca- <b>S-P2-S</b> -ac	gt- <b>Q-S-Q</b> -tgg	2
64	cca- <b>P4</b> -ac	gt- <b>Q</b> -tgg	3
65	acc- <b>P4</b> -ca	tg- <b>Q</b> -ggt	2
66	cca- <b>P2-S-P2</b> -ac	gt- <b>S-Q-S</b> -tgg	3
67	cca- <b>P2-P2</b> -ac	gt- <b>Q</b> -tgg	3
68	ca- <b>P2-P2</b> -acc	ggt- <b>Q</b> -tg	2
69	H-K(C2Pyr)-PQpYEEIPI-K(C1Anthr)-NH <sub>2</sub>		15
Peptid = RPLALWRS			
70	cca- <b>P2-S-P2</b> -ac	gt- <b>S-Q-S</b> -tgg	3
71	cca- <b>P2-S-P2</b> -ac-Ahex-	-Ahex-gt- <b>S-Q-S</b> -tgg	4
72	cca- <b>P2-S-P2</b> -ac-ßA-	-ßA-gt- <b>S-Q-S</b> -tgg	3
73	cca- <b>P2-S-P2</b> -ac	gt- <b>S-Q-S</b> -tgg	3
74	cca- <b>P2-S-P2</b> -ac-Ahex-	-Ahex-gt- <b>S-Q-S</b> -tgg	4
75	cca- <b>P2-S-P2</b> -ac	gt- <b>S-Q-S</b> -tgg	3
76	cca- <b>P2-P2</b> -ac	gt- <b>Q</b> -tgg	22
77	cca- <b>P2-P2</b> -ac-Ahex-	-Ahex-gt- <b>Q</b> -tgg	12
78	cca- <b>P2-P2</b> -ac-ßA-	-ßA-gt- <b>Q</b> -tgg	18
79	cca- <b>P2-P2</b> -ac	gt- <b>Q</b> -tgg	2
80	cca- <b>P2-P2</b> -ac-Ahex-	-Ahex-gt- <b>Q</b> -tgg	3
81	cca- <b>P2-P2</b> -ac-ßA-	-ßA-gt- <b>Q</b> -tgg	4
82	H-K(C2Pyr)-K(C2Pyr)-RPLALWRS-K(C1Anthr)-NH <sub>2</sub>		19

Ahex = Aminohehexansäure; ßA = ß-Alanin; **P2**, **P4** = Fluorophor; **Q** = Quencher; **S** = *Spacer*.

Für einen möglichen Vergleich mit unstrukturierten Peptidsonden wurden diese ebenfalls synthetisiert. Die Pyren- und Anthrachinoneinheit wurden dabei an  $\varepsilon$ -Aminofunktion des Lysins in Analogie zu der Strategie für die FAM/Dabcyl-markierten PNA-Peptid-Konjugate (Kapitel 4.1.2) gekuppelt.

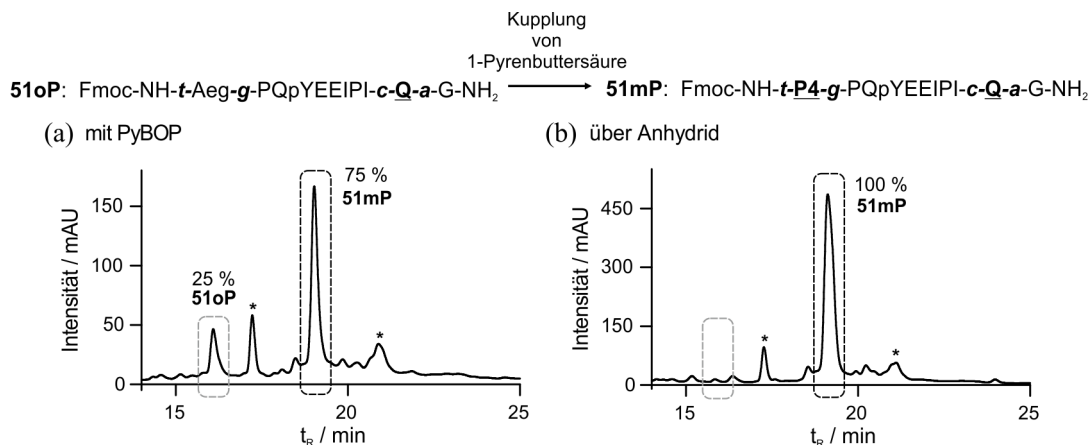
Im Fortgang der Herstellung der *IS-HPBs* traten eine Vielzahl an Problemen auf, die zu erheblichen Ausbeuteverlusten führten und mit ihrer Lösung in den folgenden Unterkapiteln geschildert werden.

### Kupplung der Pyrencarbonsäure

Für die Anbindung der Pyreneinheiten an die Oligomersequenz wurde eine zweifache Kupplung bis zu einer Dauer von 10 h mit 10 Äq. der entsprechenden Carbonsäure (1-Pyrenessigsäure oder 1-Pyrenbuttersäure), 10 Äq. PyBOP mit 20 Äq. NMM in DMF durchgeführt. Im Gegensatz zur Pyrenessigsäure führte die Reaktion mit



Pyrenbuttersäure nicht zur quantitativen Bildung von Produkt **51mP** (Abbildung 4.8 a). Es konnte in HPLC-Spuren von Testabsplattungen stets das Produkt **51oP**

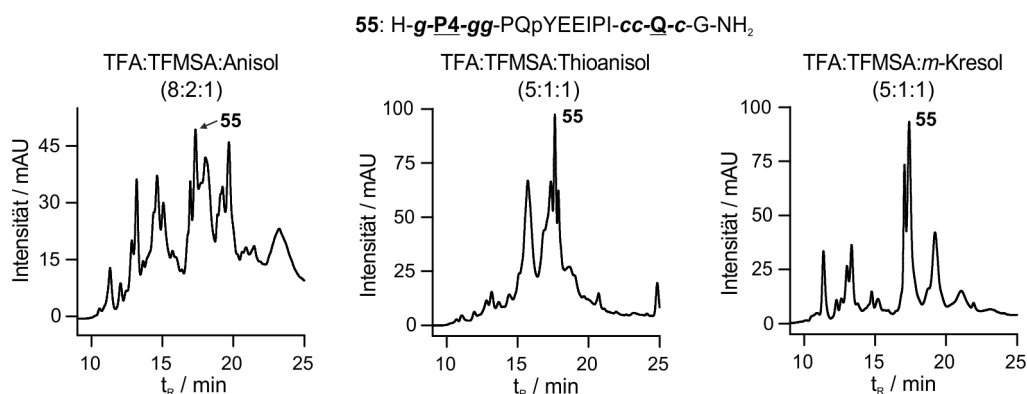


**Abbildung 4.8:** HPLC-Spuren verschiedener Kupplungsmethoden für Pyrenbuttersäure. Ausschnitte der HPLC-Spuren von Testabsplattungen der Sonde **51** nach der Kupplung von 1-Pyrenbuttersäure (a) mit PyBOP und (b) über ein intermediäres Anhydrid (3  $\rightarrow$  70 % in 20 min, 260 nm). Mit \* markierte Nebenprodukte wurden nicht in die Berechnung miteinbezogen.

ohne Pyren in Anteilen von bis zu 25 % detektiert werden. Nach erfolgloser Variation der Äquivalente und Kupplungsreagenzien führte die vorheriger Bildung des Säureanhydrids mithilfe von Diisopropylcarbodiimid zur quantitativen Umsetzung zum Zielprodukt **51mP** (Abbildung 4.8 b). Die Kupplungsstrategie mit der Bildung eines intermediären Anhydrids wurde in den folgenden Synthesen angewendet.

### Variation der Abspaltbedingungen

Die Auswertung der HPLC-Spuren von Testabsplattungen zeigte, dass als Nebenprodukt bei der Verwendung eines TFA:TFMSA:*m*-Kresol-Gemisches (16:3:1) Addukte mit Massendifferenzen von +90 und +180 von bis zu 30 % entstanden. Es wurde vermutet, dass es sich bei der Massendifferenz um das bei der Abspaltung der Z-Schutzgruppe freigesetzte Benzylkation handelt, das erneut an die Oligomersequenz addiert. Bei der Variation der Zusammensetzung der Abspaltlösung durch Veränderung der Komponentenanteile und den Einsatz unterschiedlicher *Scavenger* erwies sich die Zusammensetzung TFA:TFMSA:*m*-Kresol (5:1:1) als beste Option (am Beispiel der Sonde **55** in Abbildung 4.9). Die Bildung der Addukte konnte jedoch nicht vollständig unterdrückt werden. Eine zusätzliche Massendifferenz von +56 trat zum Teil auf und konnte einer addierten *tert*-Butylgruppe zugeordnet werden. Die

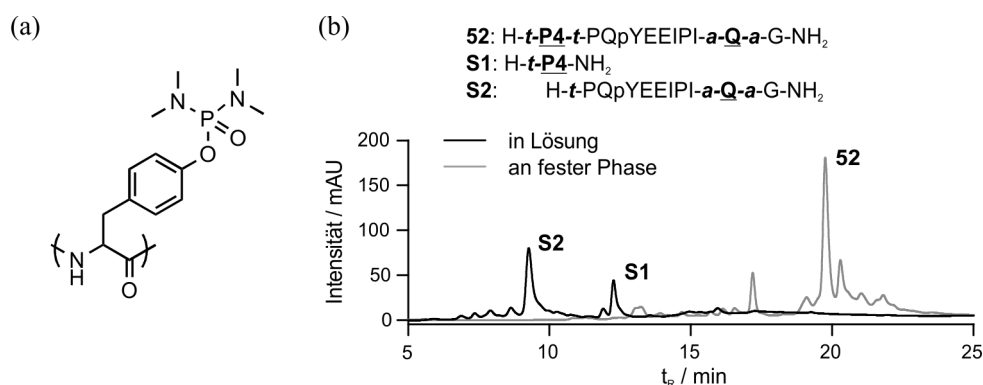


**Abbildung 4.9:** HPLC-Spuren verschiedener Abspaltbedingungen. Auswahl an Zusammensetzungen der Abspatlösung und die entsprechenden Ausschnitte der HPLC-Spuren der Sonde **55** (3 → 50 % in 20 min, 260 nm). Das Zielprodukt eluierte bei 17.4 min.

Verminderung des Adduktanteils am Rohprodukt wurde durch die 15-minütige Behandlung des Harzes mit einer TFA:H<sub>2</sub>O-Mischung (95:5) vor der Endabspaltung erreicht. Die Boc- sowie *t*Bu-Schutzgruppen wurden dadurch selektiv entfernt und gewegewaschen und konnten somit nicht erneut an die Oligomersequenz addieren.

### Schutzgruppenabspaltung am Phosphotyrosin-Baustein

Die hydrolytische Abspaltung der Bisdimethylamino-Schutzgruppe am Phosphotyrosin-Baustein (Abbildung 4.10 a) wurde bisher durch Zugabe von 10 % Wasser zur Abspatlösung und Schütteln über Nacht realisiert. Eine Übertragung auf die Aufarbeitung der *IS-HPBs* war nicht möglich, da bei der Verwendung der Abspatlösung für die Boc-basierte Festphasensynthese (TFA:TFMSA:*m*-Kresol, 5:1:1) eine quan-



**Abbildung 4.10:** (a) Struktur des geschützten Phosphotyrosin-Bausteins. (b) HPLC-Spuren von verschiedenen Methoden zur Abspaltung der Schutzgruppe am Beispiel von Sonde **52** (3 → 50 % in 20 min, 260 nm).

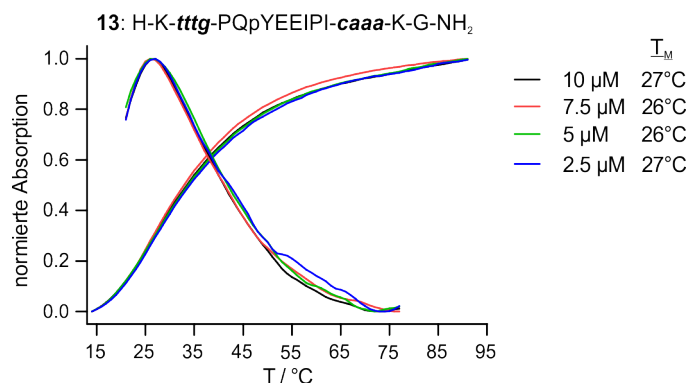
titative Sondenspaltung über Nacht bei einem Wasserzusatz erfolgte (am Beispiel von Sonde **52** in Abbildung 4.10 b). Die extrem sauren Bedingungen durch den Einsatz von TFMSA begünstigen die hydrolytische Spaltung der Oligomersequenz C-terminal zu der Fluorophoreinheit. Bei einer Verkürzung der Entschüttungsdauer fand keine Spaltung des Oligomers statt, jedoch in gleicher Weise keine quantitativen Freisetzung der Phosphateinheit. Die Entschüttung wurde an fester Phase durch die 3-stündige Behandlung des Harzes mit einer TFA:H<sub>2</sub>O (9:1)-Mischung vorgenommen, bei der keine Nebenreaktionen detektierbar waren (Abbildung 4.10 b).

## 4.2 Charakterisierung der Stabilität des intramolekularen Duplexes der PNA-Peptid-Konjugate

Bevor die synthetisierten PNA-Peptid-Konjugate ihren Einsatz fanden, wurde die Stabilität des intramolekularen Duplexes mithilfe thermischer Denaturierungsexperimente ermittelt. Dafür wurden die Schmelzkurven einer Verdünnungsreihe eines Konjugats spektroskopisch aufgezeichnet. Die Schmelztemperatur  $T_M$  entspricht dabei dem Wendepunkt der Schmelzkurve bzw. dem Maximum deren erster Ableitung. Wenn die  $T_M$ -Werte bei verschiedenen Konzentrationen sich nicht signifikant voneinander unterschieden ( $\Delta T_M \leq 3\text{ K}$ ), konnte eine intermolekulare Hybridisierung der PNA-Fragmente ausgeschlossen werden. Weiterhin wurde anhand des Verlaufs der Schmelzkurve die Strukturform (quantitative Haarnadelstruktur, Mischung aus unstrukturiert und Haarnadelstruktur, unstrukturiert) des PNA-Peptid-Konjugats bei 25 °C festgelegt. Die Konjugate mit nichtkomplementären PNA-Segmenten wiesen keinen Wendepunkt in der Schmelzkurve auf und wurden somit als unstrukturiert betrachtet.

### 4.2.1 Unmarkierte & FAM/Dabcyl-markierte PNA-Peptid-Konjugate

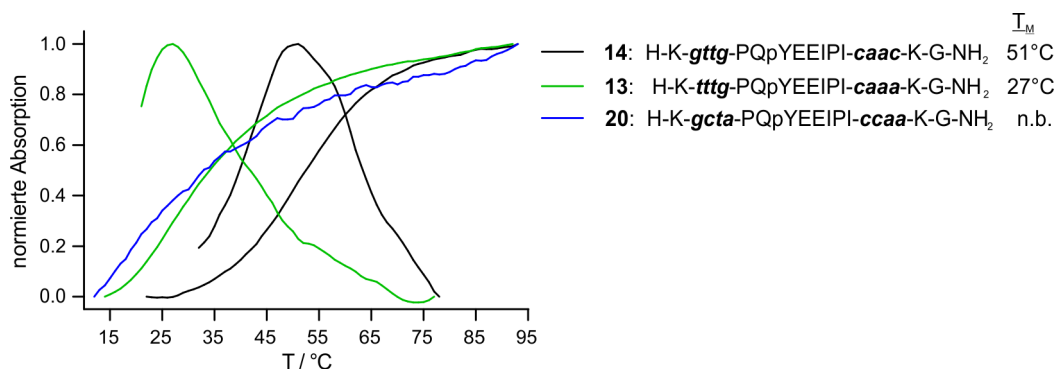
Bei den unmarkierten und FAM/Dabcyl-markierten PNA-Peptid-Konjugaten wurde die Absorption einer Verdünnungsreihe bei 260 nm über einen Temperaturgradienten verfolgt. Die Abbildung 4.11 zeigt am Beispiel der Sonde **13** den üblichen Verlauf der normierten Schmelzkurven und deren erster Ableitung bei verschiedenen Konzentrationen. Man sieht deutlich die Übereinstimmung in den Maxima der ersten Ableitungen, was die intramolekulare Hybridisierung bzw. die Bildung einer



**Abbildung 4.11:** Nachweis der intramolekularen Hybridisierung mittels thermischer Denaturierungsexperimente. Normierte Schmelzkurven und deren erste Ableitung verschiedener Konzentrationen von Sonde **13** mit den jeweiligen Schmelztemperaturen.

Haarnadelstruktur bestätigt. Bei der Betrachtung des Kurvenverlaufs wird ersichtlich, dass das Konjugat **13** bei 25  $^\circ\text{C}$  bereits prozentual geöffnet und nicht quantitativ als Haarnadelstruktur vorliegt.

Die Haarnadelstabilität der PNA-Peptid-Konjugate konnte durch die Variation der PNA-Sequenz unkompliziert eingestellt werden, was in Abbildung 4.12 am Beispiel der Schmelzkurven und deren ersten Ableitungen der PNA-Peptid-Konjugate **14**, **13** und **20** veranschaulicht ist. Der Austausch eines c-g-Basenpaares gegen ein a-t-Basenpaar führte bereits zu einer Destabilisierung der Haarnadelstruktur um 24 K. Die Kurve der Sonde **20**, bei der die PNA-Segmente keine intramolekularen Watson-Crick-Basenpaare bilden konnten, wies hingegen keine sigmoidale Form mit einem Wendepunkt auf, wodurch diese Sonde als unstrukturiert zu bezeichnen ist.



**Abbildung 4.12:** Variation der Haarnadelstabilität und Auswirkungen auf die Schmelztemperatur der PNA-Peptid-Konjugate. Normierte Schmelzkurven und deren erste Ableitung unmarkierter PNA-Peptid-Konjugate.

## 4.2 Charakterisierung der Stabilität des intramolekularen Duplexes der PNA-Peptid-Konjugate

In Tabelle 4.8 sind die ermittelten Schmelztemperaturen der unmarkierten PNA-Peptid-Konjugate sowie der verwendeten Konjugate zur Evaluation der sequenzinternen Markierung aufgeführt. Die *N*-terminale Modifikation der unmarkierten PNA-Peptid-Konjugate mit Aspartateinheiten bewirkte eine Stabilisierung der Haarnadelstruktur um bis zu 7 K ( $T_M$ , **14** = 51 °C  $\rightarrow$   $T_M$ , **17** = 58 °C), deren Ursache bisher ungeklärt blieb.

**Tabelle 4.8:** Übersicht der Schmelztemperaturen der unmarkierten und FAM/Dabcyl-markierten PNA-Peptid-Konjugate.

Sequenz				$T_M$ [°C]
X	<i>PNA I</i>	<i>PNA II</i>		
<i>unmarkierte Sonden</i>				
(H-X-K- <i>PNA I</i> -Peptid- <i>PNA II</i> -K-G-NH <sub>2</sub> )				
Peptid = PQpYEEIPI				
14	-			51
15	D			55
16	DD	gttg	caac	57
17	DDD			58
13	-			27
18	DD	tttg	caaa	31
19	DDD			34
Peptid = TEGQpYQPQP				
23	DD	gttg	caac	58
24		tttg	caaa	36
<i>FAM/Dabcyl-markierte Sonden</i>				
(H-X- <i>PNA I</i> -PQpYEEIPI- <i>PNA II</i> -G-NH <sub>2</sub> )				
34	DD	K(FAM)-gttg	caac-K(Dabcyl)	69
35		gttg-K(FAM)	K(Dabcyl)-caac	65

Bestimmung mittels thermischer Denaturierungsexperimente; Bedingungen: 12 bzw. 20-95 °C, 260 nm, 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4.

Die Einführung der Chromophore FAM und Dabcyl an den  $\epsilon$ -Aminofunktionen der Lysineinheiten resultierte in einer weiteren Stabilisierung der Haarnadelstruktur um bis zu 12 K ( $T_M$ , **16** = 57 °C  $\rightarrow$   $T_M$ , **34** = 69 °C), was mit der zusätzlichen  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zwischen den Chromophoren zu erklären ist.

### 4.2.2 PNA-Peptid-Konjugate mit stamminterner Markierung

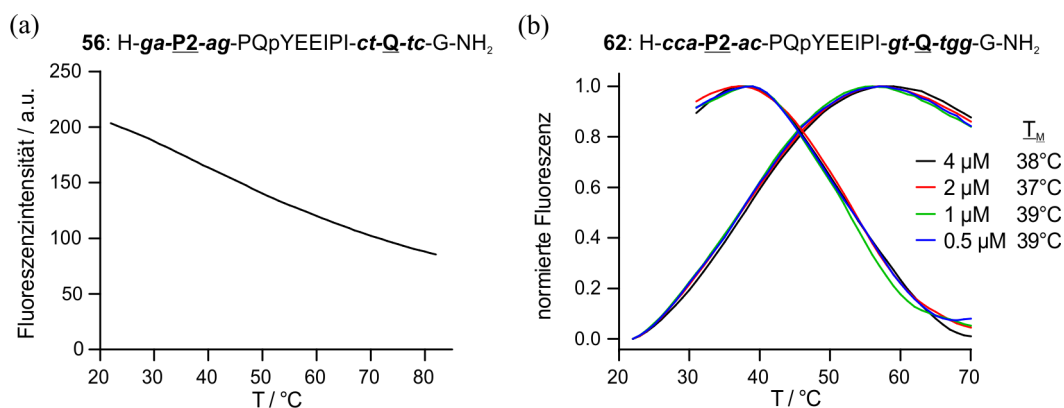
Die Analyse der PNA-Peptid-Konjugate mittels UV-Spektroskopie war im Falle der *IS-HPBs* nicht umsetzbar, da die Pseudonukleobasen den hyperchromen Effekt entschieden störten und somit keine sigmoidale Form der Schmelzkurven bei 260 nm

erhalten werden konnte. Es wurden folglich die Schmelzkurven einer Verdünnungsreihe fluoreszenzspektroskopisch mithilfe der Pyrenemission bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 400 nm (monomerbasierte *IS-HPBs*) bzw. 480 nm (excimerbasierte *IS-HPBs*) aufgenommen. In Tabelle 4.9 ist eine Auswahl an synthetisierten, SH2-spezifischen PNA-Peptid-Konjugate mit den ermittelten Haarnadelstabilitäten aufgelistet. Eine Haarnadelstruktur konnte weder für die trimeren, noch für die tetrameren PNA-Segmente erhalten werden. Die jeweiligen Kurvenverläufe wiesen eine abnehmende Fluoreszenzintensität mit steigender Temperatur auf, was am Beispiel der Sonde **56** in Abbildung 4.13 a illustriert ist. Erst die Verlängerung zu c-g-reichen, pentameren Sequenzen erzeugte einen stabilen PNA-Duplex. Die Schmelzkurven einer Verdünnungsreihe sind am Beispiel von Sonde **62** in Abbildung 4.13 b dargestellt.

**Tabelle 4.9:** Schmelztemperaturen einer Auswahl an SH2-spezifischen PNA-Peptid-Konjugaten.

	Sequenz		$T_M$ [°C]
	(H-PNA I-PQpYEEIPI-PNA II-G-NH <sub>2</sub> )		
	PNA I	PNA II	
<b>46</b>	g-P2-S-g	c-Q-S-c	n.b.
<b>47</b>	g-P2-g	c-Q-c	n.b.
<b>50</b>	g-P4-g	c-Q-c	n.b.
<b>53</b>	g-P2-gg	cc-Q-c	n.b.
<b>54</b>	gg-P2-g	c-Q-cc	n.b.
<b>55</b>	gg-P4-g	c-Q-cc	n.b.
<b>56</b>	ga-P2-ag	ct-Q-tc	n.b.
<b>57</b>	ga-P4-ag	ct-Q-tc	n.b.
<b>58</b>	gg-P2-gg	cc-Q-cc	41
<b>59</b>	cc-P2-cc	gg-Q-gg	55
<b>60</b>	tg-P2-gg	cc-Q-ca	29
<b>61</b>	tg-P4-gg	cc-Q-ca	39
<b>62</b>	cca-P2-ac	gt-Q-tgg	38
<b>63</b>	cca-S-P2-S-ac	gt-Q-S-Q-tgg	36
<b>64</b>	cca-P4-ac	gt-Q-tgg	51
<b>65</b>	acc-P4-ca	tg-Q-ggt	56
<b>66</b>	cca-P2-S-P2-ac	gt-S-Q-S-tgg	46
<b>67</b>	cca-P2-P2-ac	gt-Q-tgg	35
<b>68</b>	ca-P2-P2-acc	ggg-Q-tg	68

Bestimmung mittels thermischer Denaturierungsexperimente; n.b. = nicht bestimmbar; Bedingungen: 20-95 °C, 140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4,  $\lambda_{ex}$  = 340 nm,  $\lambda_{em, Monomer}$  = 400 nm,  $\lambda_{em, Excimer}$  = 480 nm.



**Abbildung 4.13:** Thermische Denaturierung eines unstrukturierten (**56**) und strukturierten PNA-Peptid-Konjugats (**62**). (a) Temperaturabhängige Fluoreszenzintensität von Sonde **56** (2 μM). (b) Normierte Schmelzkurven und deren erste Ableitung einer Verdünnungsreihe von Sonde **62**.

Der Nachweis einer intramolekularen Hybridisierung konnte durch die Übereinstimmung der normierten Schmelzkurven und deren erster Ableitung erbracht werden. Der Austausch eines c-g-Basenpaares gegen ein a-t-Basenpaar führte auch bei den *IS-HPBs* zu einer deutlichen Destabilisierung der Haarnadelstruktur ( $T_M$ , **58** = 41 °C →  $T_M$ , **60** = 29 °C). Die Flankierung der Pyreneinheit mit Pyrimidinbasen bewirkte, im Vergleich zu dem Purinbasen, einen Anstieg der Haarnadelstabilität ( $T_M$ , **58** = 41 °C →  $T_M$ , **59** = 55 °C;  $T_M$ , **64** = 51 °C →  $T_M$ , **65** = 56 °C). Die Ursache lag vermutlich in der erhöhten  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung des Pyrens mit den Purinbasen des komplementären PNA-Segments, was die Hybridisierung beider PNA-Segmente verstärkte. Der Einsatz eines längeren Linkers für die Anbindung der Pyreneinheit bei Sonde **61** resultierte in einer um 10 K erhöhten Duplexstabilität der PNA-Stammregion gegenüber dem kürzeren Linker bei Sonde **60**. Ein analoger Effekt war bei den Sonden **62** und **64** zu beobachten. Der Einbau einer zweiten Pyreneinheit zog eine Destabilisierung der Haarnadelstruktur nach sich, was jedoch durch die Einführung von *Spacer*-Einheiten kompensiert werden konnte ( $T_M$ , **62** = 38 °C ↔  $T_M$ , **67** = 35 °C ↔  $T_M$ , **66** = 46 °C). Die Nukleobasensequenz der Stammregionen war entscheidend für die Duplexstabilität der PNA-Stammregionen. Dies wird nochmals anhand des Vergleichs der Sonde **67** (35 °C) mit Sonde **68** (68 °C) verdeutlicht. Allein die veränderte Positionierung eines c-g-Basenpaares führte zu einer Stabilisierung um 33 K.

Die MMP-7-spezifischen Sonden in Tabelle 4.10 wurden ausgehend von den excimerbasierten SH2-spezifischen Sonden **66** (mit *Spacer*) und **67** (ohne *Spacer*) konstruiert. Die *N*-terminale Modifikation **X** aus drei Aspartateinheiten und die

Integration eines Linkers, wie Aminohexansäure (Ahex) und  $\beta$ -Alanin, in die Sequenz veränderte signifikant die Haarnadelstabilität. Der Einbau der peptidflankierenden Ahex- bzw.  $\beta$ A-Einheiten zog eine Destabilisierung der doppelhelikalen PNA-Stammregion nach sich, die durch die *N*-terminale Modifikation mit drei Aspartateinheiten mehr als ausgeglichen wurde ( $T_M$ , **70** = 49 °C  $\leftrightarrow$   $T_M$ , **71** = 46 °C  $\leftrightarrow$   $T_M$ , **73** = 55 °C). Der Einbau von *Spacer*-Einheiten erhöhte die Haarnadelstabilität (z. B.  $T_M$ , **76** = 44 °C  $\rightarrow$   $T_M$ , **70** = 49 °C). Offensichtlich benötigten die Chromophore einen größeren Raum, um eine starke Basenstapelwechselwirkung einzugehen.

**Tabelle 4.10:** Übersicht der Schmelztemperaturen der MMP-7-spezifischen *IS-HPBs*.

	Sequenz (H-X-PNA I-RPLALWRS-PNA II-G-NH <sub>2</sub> )					$T_M$ [°C]
	X	PNA I			PNA II	
<b>70</b>			-	-		49
<b>71</b>	-	cca- <b>P2-S-P2</b> -ac	-Ahex-	-Ahex-	gt- <b>S-Q-S</b> -tgg	46
<b>72</b>			- $\beta$ A-	- $\beta$ A-		46
<b>73</b>			-	-		55
<b>74</b>	DDD	cca- <b>P2-S-P2</b> -ac	-Ahex-	-Ahex-	gt- <b>S-Q-S</b> -tgg	51
<b>75</b>			- $\beta$ A-	- $\beta$ A-		55
<b>76</b>			-	-		44
<b>77</b>	-	cca- <b>P2-P2</b> -ac	-Ahex-	-Ahex-	gt- <b>Q</b> -tgg	♦
<b>78</b>			- $\beta$ A-	- $\beta$ A-		41
<b>79</b>			-	-		52
<b>80</b>	DDD	cca- <b>P2-P2</b> -ac	-Ahex-	-Ahex-	gt- <b>Q</b> -tgg	50
<b>81</b>			- $\beta$ A-	- $\beta$ A-		47

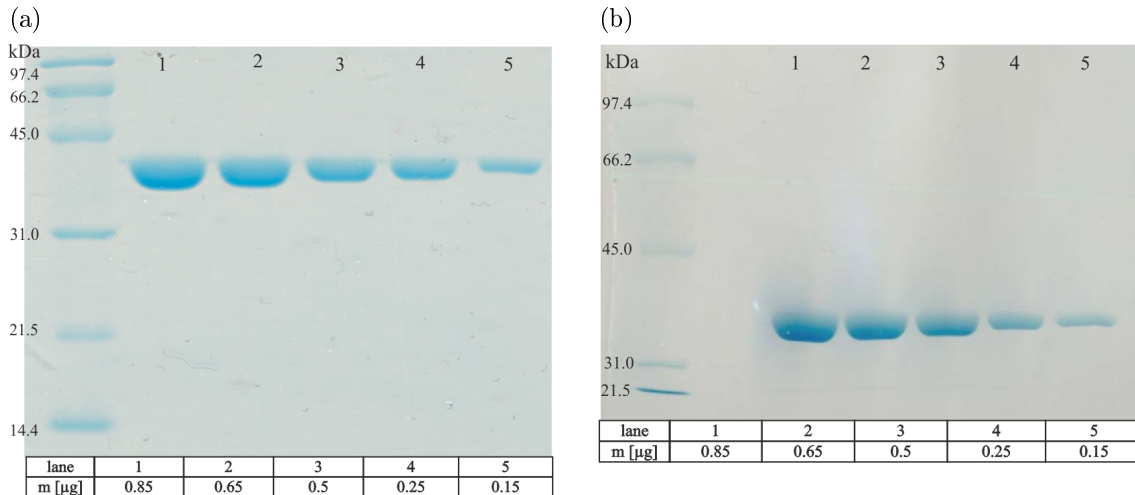
Bestimmung mittels thermischer Denaturierungsexperimente; Bedingungen: 20-95 °C, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4,  $\lambda_{ex}$  = 340 nm,  $\lambda_{em, Excimer}$  = 480 nm. ♦ Konzentrationsabhängige Schmelzkurven deuten auf eine intermolekulare Hybridisierung hin.

### 4.3 Expression und Isolierung der Src und Lck SH2-Domäne

Die SH2-Domänen der Src- und Lck-Kinase wurden eigenständig als GST-Fusionsproteine im gentechnischen Labor der Sicherheitsstufe 1 des Instituts mithilfe eines kompetenten *E. coli*-Bakterienstamms exprimiert und mithilfe diverser Verfahren isoliert. Die Konzentration der Proteinlösung wurde jeweils mit einem Mikrovolumenphotometer und literaturbekannten Extinktionskoeffizienten bei 280 nm



( $\varepsilon_{GST-Src SH2} = 54890 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $\varepsilon_{GST-Lck SH2} = 54150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )<sup>[180]</sup> ermittelt. Die Reinheit des jeweiligen Expressionsansatzes wurde mithilfe der Polyacrylamidgелеlektrophorese (PAGE) unter Verwendung von denaturierenden Bedingungen durch den Zusatz von Sodiumdodecylsulfat (SDS) verifiziert (Abbildung 4.14).

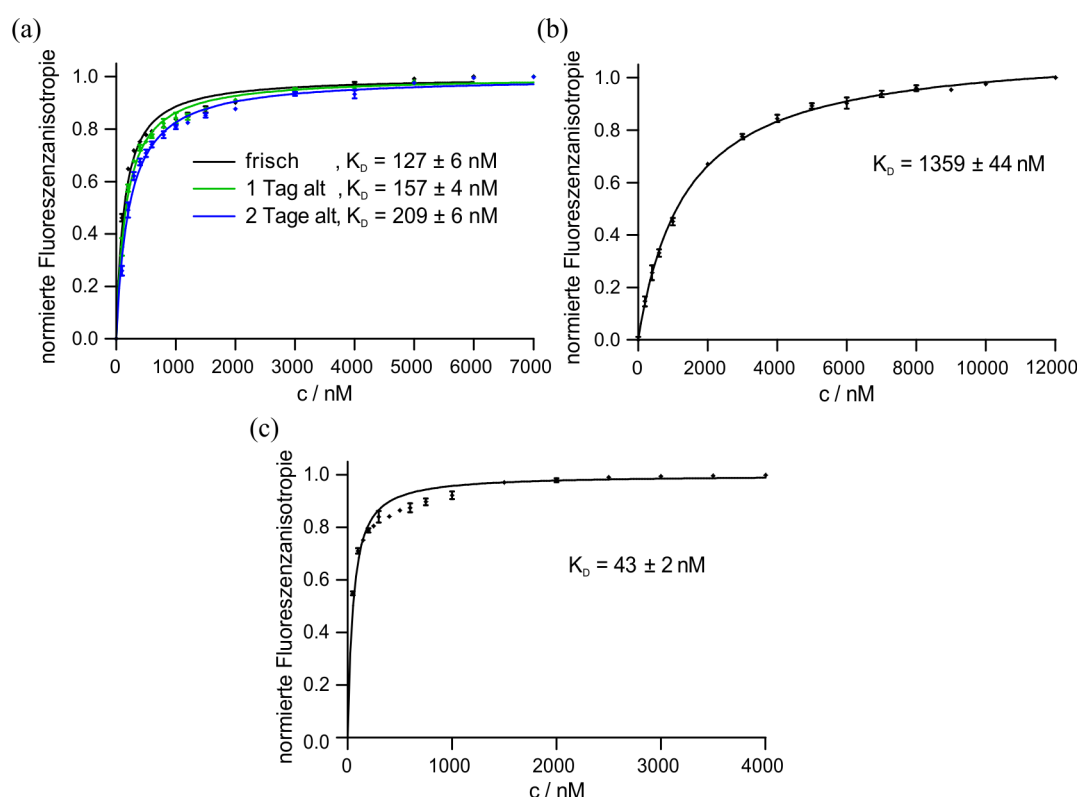


**Abbildung 4.14:** SDS-PAGE der gereinigten Fusionsproteine: (a) GST-Lck SH2 (40 kDa) und (b) GST-Src SH2 (38 kDa). Bedingungen: 12 bzw. 10 % Tris-Glycin-Gel beladen mit verschiedenen Konzentrationen sowie einem Massenstandard. Anfärbung mit Coomassie.

Um Artefakte durch verschiedene Salze während der ITC-Messungen zu vermeiden und eine Vergleichbarkeit erhaltener Werte zu erreichen, sollten die Protein-domänen Src und Lck SH2 in demselben Puffer vorliegen. Die Src SH2-Domäne wurde zunächst im HEPES-Puffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -ME, pH 7.5) isoliert. Es zeigte sich jedoch im Laufe der Messungen eine geringe Stabilität, die durch eine Präzipitation gekennzeichnet war, weshalb der Puffer variiert wurde. Für die Lck SH2-Domäne wurde in Anlehnung an die Literatur ein MOPS-Puffer (20 mM MOPS, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -ME, pH 7.2) verwendet.<sup>[181]</sup> Wiederholte Versuche, die Src SH2-Domäne in diesen Puffer zu überführen, scheiterten. Sobald eine Aufkonzentrierung erfolgte, war eine nahezu quantitative Präzipitation des Proteins zu beobachten. Aus früheren Arbeiten aus der Arbeitsgruppe Seitz war eine hohe Stabilität in einem Phosphat-Puffer (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -ME, pH 7.4) bekannt.<sup>[182]</sup> Somit wurde ein weiterer Expressionsansatz der Src SH2-Domäne in Phosphat-Puffer isoliert. Beide SH2-Domänen weisen oxidationsempfindliche Aminosäuren im Bereich der Bindungstasche auf, was den Einsatz einer reduzierenden Agenz unerlässlich

machte. Dem Puffer wurde für die ITC-Untersuchungen  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) zugesetzt, da dieses im Vergleich zu Dithiothreitol (DTT) eine kleinere Oxidationsenthalpie aufweist. Der Beitrag der Oxidationswärme an der gemessenen Wärme wurde somit im ITC-Experiment minimiert. Für die Verwendung in fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen wurden kleinere Expressionsansätze verwendet und in den Puffern  $\beta$ -ME, aufgrund seiner Toxizität, gegen DTT ausgetauscht.

Das Bindungsverhalten der isolierten Proteindomänen wurde anhand der  $K_D$ -Werte des Referenzpeptids FAM-GpYEEIA-NH<sub>2</sub> eingeschätzt, die durch Messung der Fluoreszenzanisotropie erhalten wurden (Abbildung 4.15). Für die Src SH2-



**Abbildung 4.15:** Bestimmung der  $K_D$ -Werte des Referenzpeptids FAM-GpYEEIA-NH<sub>2</sub> mit diversen, isolierten SH2-Domänen mittels Fluoreszenzanisotropie: (a) mit verschiedenen alten Aliquoten von GST-Src SH2 in HEPES-Puffer, (b) mit GST-Src SH2 in Phosphat-Puffer, (c) mit GST-Lck SH2 in MOPS-Puffer. Die Proteinlösungen wurden bei 4 °C gelagert. Die Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

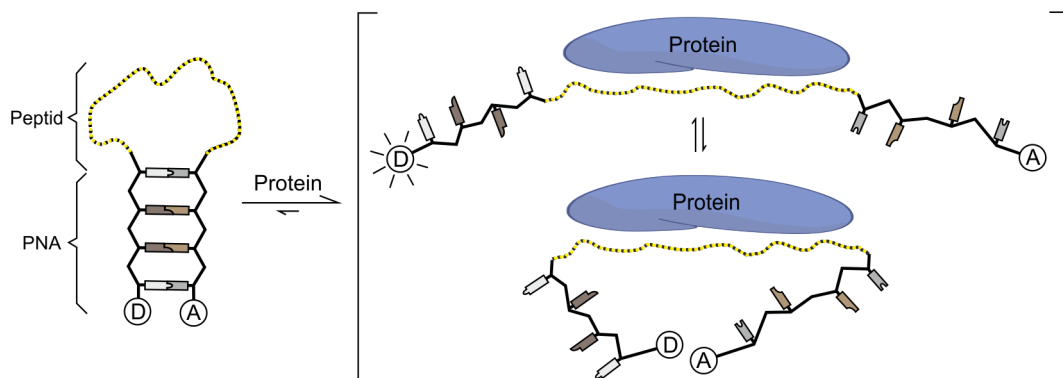
Domäne im HEPES-Puffer konnte ein  $K_D$ -Wert von  $127 \pm 6$  nM ermittelt werden, der somit kleiner als der bisher bekannte  $K_D$ -Wert von 240 nM war.<sup>[182]</sup> Jedoch wies die Proteindomäne bereits nach einem Tag mit einer Lagertemperatur von 4 °C eine verringerte Affinität auf, wodurch jeden Mess-

tag ein neues Aliquot verwendet werden musste. Der  $K_D$ -Wert im Phosphat-Puffer war mit  $1359 \pm 44$  nM um eine Größenordnung schlechter als der im HEPES-Puffer, was die Wichtigkeit der Pufferwahl noch einmal unterstreicht. Die Lck SH2-Domäne im MOPS-Puffer zeigte mit einem  $K_D$ -Wert von  $43 \pm 2$  nM eine höhere Affinität zum Referenzpeptid als die Src SH2-Domäne und war ebenfalls geringer der bisher bekannte  $K_D$ -Wert von 270 nM.<sup>[183]</sup>

Die beiden nah verwandten SH2-Domänen zeigten bereits bzgl. des Referenzpeptids eine differenzierte Affinität. Vergleiche hinsichtlich der Selektivität, die sich maßgeblich über die Affinität definiert, waren somit nicht möglich. Mit keinem der durchgeführten Expressionsansätze konnte ein ähnliches Bindungsverhalten der SH2-Domänen der Src und Lck-Kinase zu dem pYEEI-Motiv, das in der Literatur beschrieben wurde, festgestellt werden.<sup>[184]</sup> Peptidische Verunreinigungen und Fehlfaltungen, die zu verringerten Affinitäten beitragen, konnten mit der Durchführung einer nativen Gelelektrophorese ausgeschlossen werden.

## 4.4 Erhöhung der Responsivität durch alternative Markierung der PNA-Peptid-Konjugate

Für die Untersuchung von Proteinen mit peptidbasierten Sonden in homogener Lösung wurden bisher in der Arbeitsgruppe von Prof. Seitz terminal markierte *Hairpin Peptide Beacons* (HPBs) verwendet (Abbildung 4.16). Bei einem reversiblen Bindungsvorgang, z.B. der Detektion von SH2-Domänen, konnten bisher nur geringe Fluoreszenzanstiege von 1.3-3.3 unter Verwendung diverser Donor-Akzeptor-Paare, deren Energieübertragung vorwiegend auf FRET basierte, erzielt werden.<sup>[183]</sup> Die

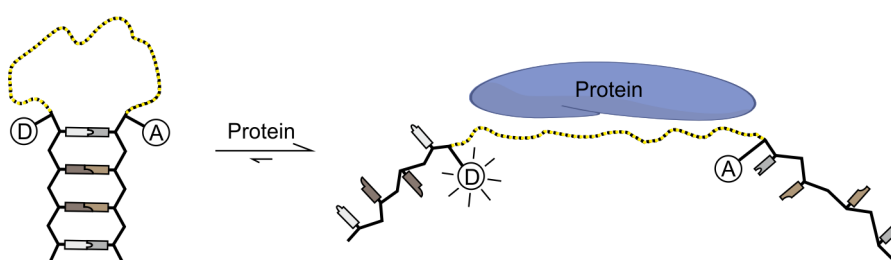


**Abbildung 4.16:** Funktionsprinzip von HPBs mit terminaler Fluoreszenzmarkierung. D = Donor, A = Akzeptor.

Dualmarkierung mit Pyren-Einheiten führte zu einer maximal 12.5-fachen Signalintensivierung, die auf einem Anstieg der Monomeremission infolge der Bindung beruhte.<sup>[23]</sup> Diese Signalverstärkung liegt jedoch deutlich unter der, die mit haarnadelstrukturierten DNA-Sonden, den *Molecular Beacons*, in der Untersuchung von Nukleinsäuren erhalten wurden, die sogar bis zu dreistellige Zahlenwerte aufwiesen.<sup>[24–26]</sup> Die Signalgebung eines *MBs* basiert auf der Hybridisierung einer meist 15–20 Nukleotide langen Schleifensequenz mit der Ziel-DNA, wodurch ein eindeutig strukturierter helikaler Duplex gebildet wird, der die Separierung der Signalmoleküle forciert. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der Assoziation einer peptidischen Sonde in der Bindungstasche eines Proteins meist eine Wechselwirkung mit nur wenigen Aminosäuren der Erkennungssequenz (vglw. Bindung an die SH2-Domäne, Abbildung 2.2). Die übrigen Aminosäuren sowie die PNA-Segmente im Fall der PNA-Peptid-Konjugate weisen eine hohe Flexibilität auf, wodurch keine vollständige Separierung bei der bisherigen terminalen Markierung gewährleistet ist (Abbildung 4.16). Es kann somit auch im proteingebundenen Zustand zu einer Annäherung und einem effizienten Energietransfer zwischen den Signalmolekülen kommen, was die Signalgebung negativ beeinflusst und zu einer deutlichen Reduktion der Responsivität führt. Eine Verbesserung könnte durch die Einschränkung der Flexibilität und daraus resultierenden Forcierung eines festen Donor-Akzeptor-Abstands im proteingebundenen Zustand erreicht werden.

#### 4.4.1 Sequenzinterne Fluoreszenzmarkierung

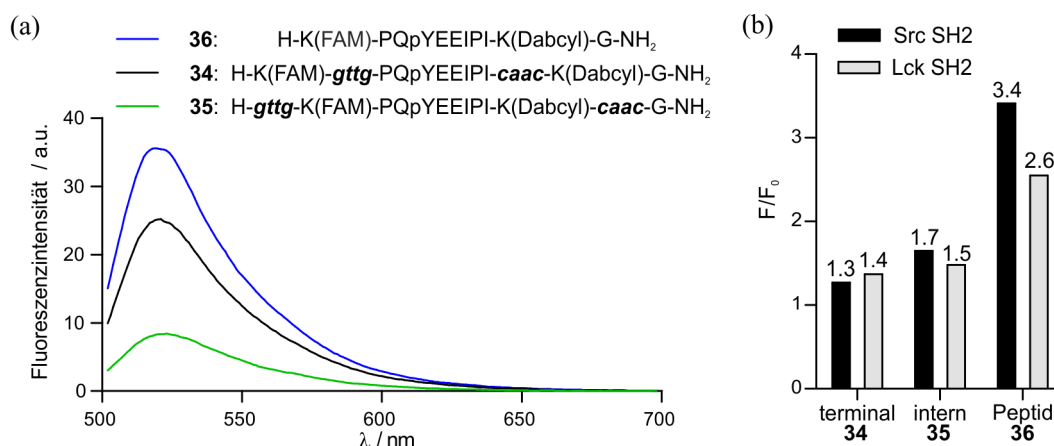
Die Fixierung des Donor-Akzeptor-Abstands im proteingebundenen Zustand sollte in einem Teilprojekt dieser Arbeit durch die sequenzinterne Markierung mit Chromophoren umgesetzt werden (Abbildung 4.17). Die Anbringung der Signalmoleküle flankierend zur Erkennungssequenz und folglich in unmittelbarer Nähe zur Bindungstasche sollte zur Einschränkung der Flexibilität führen und somit durch ei-



**Abbildung 4.17:** Funktionsprinzip von *HPBs* mit sequenzinterner Fluoreszenzmarkierung. D = Donor, A = Akzeptor.

ne verringerte Effizienz des Energietransfers im geöffneten Zustand gekennzeichnet sein. Diesem neuen Sondendesign sollten die bisher verwendeten terminal markierten *HPBs* und die dualmarkierten Peptide gegenübergestellt werden. Die Untersuchung der verschiedenen Sondentypen erfolgte ausgehend von der Peptidsequenz PQpYEEIPI, die spezifisch von den SH2-Domänen der Src- und Lck-Kinase gebunden wird. Diese Erkennungssequenz wurde im Falle der *HPBs* mit flankierenden, komplementären PNA-Segmenten versehen, die die quantitative Bildung einer Haarnadelstruktur gewährleisteten und deren Synthese im Kapitel 4.1.2 beschrieben wurde. Als Fluoreszenzdonor fungierte FAM (5(6)-Carboxyfluorescein), das sich durch einen hohen Extinktionskoeffizienten ( $\varepsilon_{492\text{ nm}} = 78000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) und eine Anregbarkeit im sichtbaren Wellenlängenbereich ( $\lambda_{ex} \approx 485 \text{ nm}$ ) auszeichnet. Der Energietransfermechanismus des Akzeptormoleküls sollte stark distanzabhängig sein, um einen maximalen Effekt in der Signalgebung während des Bindungsvorgangs zum Protein zu erzielen. Aufgrund dessen wurde die Dabcyl-Gruppe als Fluoreszenzakzeptor verwendet, deren Löschmechanismus bei kurzen Abständen auf eine effiziente Stoßdeaktivierung beruht und bei größeren Abständen in einen FRET (Förster-Radius  $R_0 = 46 \text{ Å}$ ) übergeht.<sup>[185]</sup> Die Proteinbindung sollte folglich durch einen Anstieg der FAM-Emission bei  $\lambda_{em} \approx 520 \text{ nm}$  gekennzeichnet sein.

Die Sonden **34**, **35** und **36** wurden auf ihre Hintergrundfluoreszenz  $F_0$  und den Signalanstieg  $F/F_0$  bei der Bindung an die SH2-Domänen untersucht. Dafür wurden die Sonden jeweils in einer  $2 \mu\text{M}$  Konzentration in einem Phosphat-Puffer (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM  $\text{NaCl}$ , 2 mM DTT, pH 7.4) eingesetzt und mit einer Lösung der Src oder Lck SH2-Domäne bis zu einem maximalen Signalanstieg titriert. Die nach einer Anregung bei 485 nm aufgezeichneten Fluoreszenzspektren ohne Proteinzusatz zeigten erwartungsgemäß eine kleinere Signalintensität der terminal (**34**) und sequenzintern markierten Sonden (**35**) gegenüber der Peptidsonde **36** (Abbildung 4.18 a). Durch die Strukturierung wurde die Proximität zwischen Fluorophor und Quencher erhöht und somit die Effizienz des Energietransfers gesteigert, was zu kleineren Hintergrundfluoreszenzen führte. Die Löschung der FAM-Emission im freien Zustand war bei der sequenzinternen Markierung um ein Vielfaches größer, was auf einen kleineren Abstand zwischen Fluorophor und Quencher schließen lässt. Unerwartet waren jedoch die für die Emissionswellenlänge  $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$  ermittelten Signalanstiege  $F/F_0$  bei der Sättigung mit der Src SH2-Domäne (Abbildung 4.18 b). Entgegen der Annahme und trotz des hohen  $F_0$ -Wertes wies die Peptidsonde **36** mit einer 3.4-fachen Signalverstärkung den größten Wert auf. Die Fluoreszenzintensität der Sonde **35** mit sequenzinterner Markierung im proteingebundenen Zustand



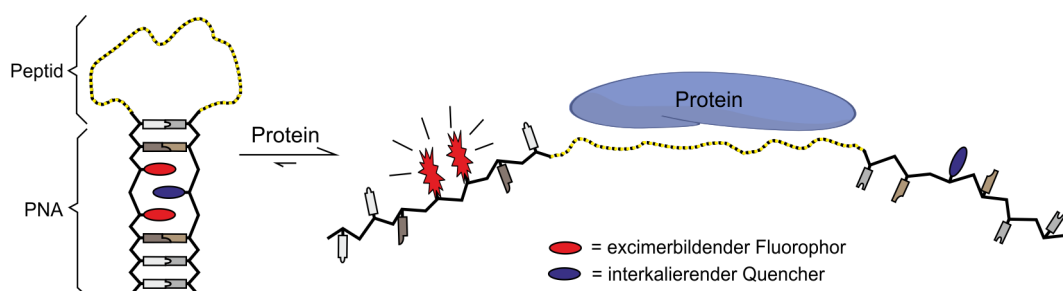
**Abbildung 4.18:** Vergleich der fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der verschiedenen Sondentypen. (a) Fluoreszenzspektren ohne Proteinzugabe. (b) Signalanstiege bei  $\lambda_{em} = 520$  nm nach Titration mit 50  $\mu$ M Src SH2 bzw. 20  $\mu$ M Lck SH2. Bedingungen: 2  $\mu$ M Sonde, 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7.4,  $\lambda_{ex} = 485$  nm.

war trotz analogen Abstandes zwischen Fluorophor und Quencher deutlich kleiner als die der Peptidsonde **36** ( $F_{520\text{ nm}, \mathbf{35}} = 14 \leftrightarrow F_{520\text{ nm}, \mathbf{36}} = 121$ ). Eine Ursache ist wahrscheinlich der löschende Effekt der zum Fluorophor benachbarten Guaninbase,<sup>[186,187]</sup> der bei der Peptidsonde nicht vorliegt. Dieser Nachteil der hier verwendeten, fluoreszenzmarkierten PNA-Peptid-Konjugate kann durch den Einsatz alternativer Fluorophore eliminiert werden. Des Weiteren haben die zum Fluorophor benachbarten Nukleobasen einen immensen Einfluss auf die Signalintensität der Fluorophoremmission, was noch ausführlicher in dem Kapitel 4.4.3 diskutiert wird. Die generell geringen Signalverstärkungen bei der Detektion der SH2-Domänen sind vermutlich darauf zurückzuführen, dass der aus einer gestreckten Peptidstruktur mithilfe des Programms ChemBioDraw ermittelte, räumliche Abstand zwischen Fluorophor und Quencher im Fall der Sonden **35** und **36** bei ca. 25 Å liegt und somit weiterhin ein FRET stattfinden kann. Die Distanzunterschiede zwischen den interagierenden Chromophoren war bei den verwendeten Sonden nicht groß genug, um den vermuteten Vorteil der sequenzinternen Markierung zu bekräftigen. Es konnte durch die sequenzinterne Markierung nur eine geringfügig höhere Sensitivität als mit der bisherigen terminalen erzeugt werden. Die Markierung mit auf FRET-basierenden Systemen scheint prinzipiell nicht ratsam für die Anwendung in der Proteindetektion, da mit den zumeist kurzen peptidischen Erkennungssequenzen (8-15 Aminosäuren) keine ausreichend großen Abstände erzielt werden können, die einen FRET und somit eine Signalreduktion im gebundenen Zustand ausschließen. Auch die Ver-

wendung von alternativen Löschmechanismen, wie der Stoßdeaktivierung, Bildung von H-Dimeren oder PET bergen Nachteile. Die Emission von häufig verwendeten Xanthen-Farbstoffen und deren Derivate, den Alexa-Fluorophoren, kann durch Aminosäuren, wie Tryptophan, Tyrosin, Histidin und Methionin, der Proteinoberfläche im gebundenen Zustand gelöscht werden.<sup>[125]</sup>

#### 4.4.2 Konzept der stamminernen Fluoreszenzmarkierung

Ein alternativer Ansatz zur Verbesserung der Signalgebung wurde mit der stamminernen Fluoreszenzmarkierung verfolgt. Von den DNA-basierten Haarnadelstrukturen war bekannt, dass eine effiziente Signalgebung durch den Einbau eines Fluorophor-Quencher-Paares in die Stammregion möglich ist.<sup>[175,188,189]</sup> Die verwendeten Chromophore fungierten als Nukleobasen und waren in der Lage an der Basenstapelwechselwirkung teilzunehmen. Dieses Konzept wurde auf peptidbasierte Haarnadelstrukturen übertragen, wodurch ein neues Sondendesign mit stamminerner Markierung, der *In-Stem Hairpin Peptide Beacon* (*IS-HPB*), für die Proteindetektion generiert wurde (Abbildung 4.19).



**Abbildung 4.19:** Funktionsprinzip der *IS-HPBs* bei der Bindung an ein Zielmolekül am Beispiel eines excimerbasierten *IS-HPBs*.

Bei Studien der thermischen Stabilität von PNA-DNA-Duplexen hat sich herausgestellt, dass die Substitution einer Nukleobase durch einen polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoff zu minimalen Veränderungen der helikalen Stabilität führte.<sup>[190]</sup> Der Einbau von fluoreszenten und löschenden Pseudonukleobasen in die Stammregion der PNA-Peptid-Konjugate sollte somit einen effizienten Energieübertragung aufgrund der erzwungenen Nähe im geschlossenen Zustand ermöglichen und dadurch maßgeblich die Responsivität durch ein niedriges Hintergrundsignal erhöhen. Bei der Präsenz des Zielproteins sollte eine Öffnung der Haarnadelstruktur erfolgen, was mit einer Separierung der Fluorophor- und Quenchereinheiten einhergeht und einen Signalanstieg der Monomer- bzw. Excimeremission zur Folge hat. Es

wurde Pyren als Fluorophoreinheit eingesetzt, da es die Möglichkeit offerierte neben monomer- auch excimerbasierte Strukturen aufzubauen, die sich durch eine große Stokes-Verschiebung ( $\sim 140$  nm) und eine lange Fluoreszenzlebensdauer ( $\sim 40$ - $60$  ns) auszeichnen. Anthrachinon stellte sich bei Studien mit DNA-basierten Sonden als wirkungsvollster Quencher heraus und wurde daher in diesen Untersuchungen ebenfalls herangezogen.<sup>[175]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *IS-HPBs* ausgehend von zwei zentralen Peptidsegmenten aufgebaut, die spezifisch von den in Tabelle 4.11 aufgeführten Proteinen erkannt werden. Deren Synthese und Charakterisierung ist im Einzelnen in den Kapiteln 4.1.4 und 4.2.2 geschildert.

**Tabelle 4.11:** Verwendete Erkennungssequenzen und deren Zielproteine.

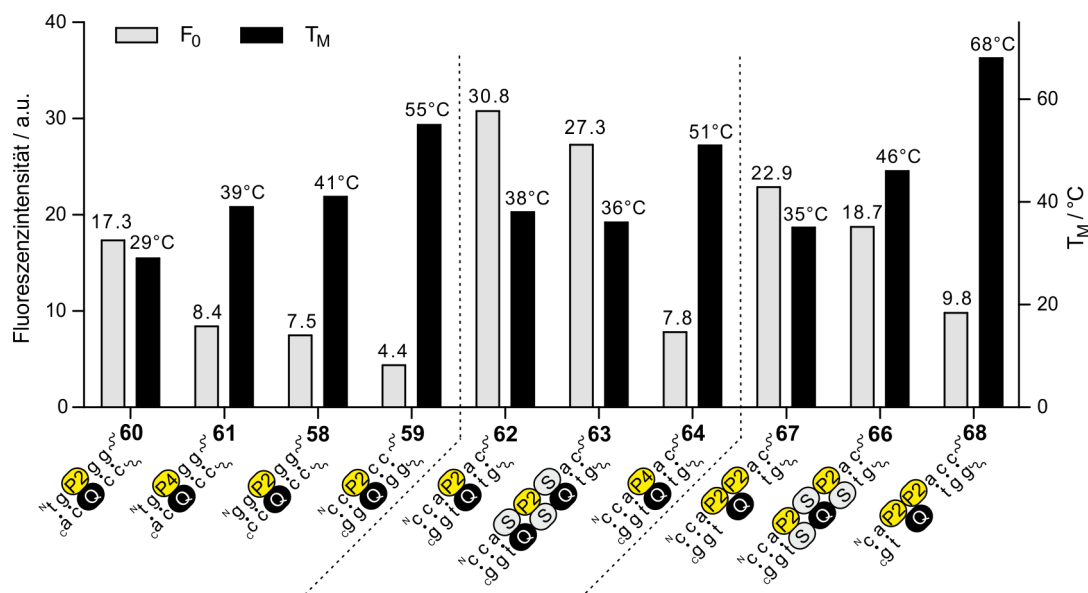
Erkennungssequenz	Zielprotein
PQpYEEIPI	Src und Lck SH2-Domäne
RPLALWRS	MMP-7

### 4.4.3 Optimierung der fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der *IS-HPBs*

Die Verbesserung der fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der *IS-HPBs* wurde unter Verwendung der SH2-spezifischen PNA-Peptid-Konjugate durchgeführt. Eine nutzbare Sonde sollte sowohl eine minimale Hintergrundfluoreszenz  $F_0$  im geschlossenen Zustand, als auch ein maximales Fluoreszenzsignal im proteingebundenen bzw. prozessierten Zustand besitzen, da dadurch eine hohe Responsivität, wie auch Sensitivität, bei der Proteindetektion gewährleistet ist.

Der  $F_0$ -Wert korrelierte sowohl bei den monomer-, als auch bei den excimerbasierten *IS-HPBs* mit der thermischen Stabilität der doppelhelikalen PNA-Stammregion (Abbildung 4.20). Je höher die Schmelztemperatur des *IS-HPBs* war, desto kleinere Fluoreszenzintensitäten wurden in Abwesenheit der Proteindomäne gemessen. Die Basenstapelung in der Stammregion führte offensichtlich zu einem effizienten Löschprozess, dessen Ausprägung sich mit der Erhöhung der Duplexstabilität verstärkte. Die Hintergrundfluoreszenz  $F_0$  wurde zusätzlich durch die Wahl der zu den interagierenden Chromophoren benachbarten Basenpaare beeinflusst. So zeigte Sonde **62**, trotz vergleichbarer Haarnadelstabilität zu Sonde **58**, eine deutlich höhere Hintergrundfluoreszenz ( $F_0$ , **62** = 30.8  $\leftrightarrow$   $F_0$ , **58** = 7.5). Die Ursachen lagen

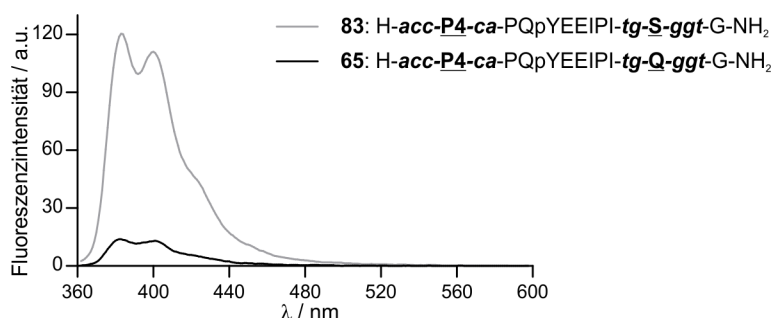




**Abbildung 4.20:** Hintergrundfluoreszenzen & Schmelztemperaturen einiger monomer- und excimerbasierten *IS-HPBs*.  $F_0$ -Werte entsprechen der Intensität bei 400 nm (monomerbasiert) bzw. 480 nm (excimerbasiert) einer 1  $\mu$ M Sonde. Illustriert sind jeweils die Stammregionen der *IS-HPBs*. P2, P4 = Fluorophor, Q = Quencher, S = *Spacer*. Peptid = PqpYEEIPI.

vermutlich in der erhöhten Flexibilität im Bereich der Chromophor-Basenpaarung aufgrund der flankierenden a-t-Basenpaare und in dem bereits zuvor erwähnten, zusätzlichen Löscheffekt der zum Fluorophor benachbarten Guanin-Basen in Sonde **58**. Der Einbau einer zweiten Quenchereinheit in Sonde **63** führte zu keiner weiteren signifikanten Reduktion der Hintergrundfluoreszenz, obwohl aus Studien mit DNA-basierten Sonden ein positiver Effekt beim Einsatz mehrerer Quencher-moleküle beschrieben wurde.<sup>[24]</sup> Wahrscheinlich wurde eine erhöhte Löscheffizienz durch den Einbau von *Spacer*-Einheiten wieder aufgehoben. Die Signalintensität der Excimeremission war kleiner als die der bauähnlichen, monomerbasierten *IS-HPBs* ( $F_0$ , **62** = 30.8  $\leftrightarrow$   $F_0$ , **67** = 22.9). Die Fluoreszenzspektren der excimerbasierten *IS-HPBs* waren stets durch zusätzliche Monomerbanden bei 380 und 400 nm gekennzeichnet, die auf eine nicht quantitative Excimerbildung hindeuten.

Die prinzipielle Notwendigkeit des Quencher-moleküls wurde am Beispiel von Sonde **65** nachgewiesen (Abbildung 4.21). Als Nebenprodukt in dessen Synthese wurde das Oligomer **83** ohne Quenchereinheit isoliert, dessen sekundäre Aminofunktion acetyliert war und somit einer *Spacer*-Einheit entsprach. Der Vergleich der Fluoreszenzspektren ohne Proteinzusatz offenbarte eine Signalreduktion der Hintergrundfluoreszenz um 88 % bei 400 nm durch den Einsatz eines Quenchers. Für eine

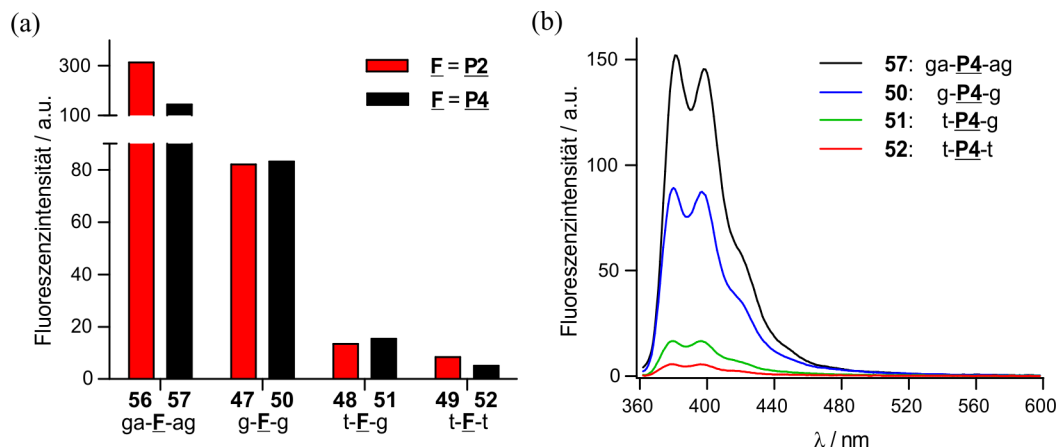


**Abbildung 4.21:** Nachweis der Notwendigkeit des Quencher-moleküls. Fluoreszenzspektren der Sonden **65** und **83**. Bedingungen:  $1\text{ }\mu\text{M}$  Sonde,  $20\text{ mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $100\text{ mM}$   $\text{NaCl}$ ,  $2\text{ mM}$  DTT, pH 7.4,  $\lambda_{ex} = 340\text{ nm}$ .

effiziente Löschung im geschlossenen Zustand waren die umgebenden Nukleobasen unzureichend und die Verwendung eines Quenchers somit unabdingbar.

Neben dem optimierten  $F_0$ -Wert war die Signalintensität der Pyrenemission im geöffneten Zustand entscheidend für die Sensitivität der jeweiligen Sonde. Anhand der unstrukturierten, monomerbasierten PNA-Peptid-Konjugate konnte der Einfluss der zum Fluorophor benachbarten Nukleobasen auf die Signalintensität im geöffneten Zustand ermittelt werden. Diese Sonden lagen vermutlich als *random coil* vor, in dem die Fluorophor-Quencher-Interaktion nicht durch Hybridisierung forciert wurde und somit der Löschprozess als ineffizient angenommen werden konnte. Die Fluoreszenzintensität wurde folglich maßgeblich durch die unmittelbare Sequenzumgebung bestimmt. Die untersuchten Sonden wiesen die höchste Signalintensität bei benachbarten a-Monomeren auf ( $F_0$ , **56** = 311.8;  $F_0$ , **57** = 143.6) (Abbildung 4.22 a). Die Fluoreszenzspektren der **P4**-markierten Sonden ohne Proteinzusatz sind im Einzelnen in Abbildung 4.22 b dargestellt. Durch die Flankierung des Fluorophors mit g-Monomeren erfolgte eine deutliche Reduktion der Signalintensität um 74 % (**P2**: **56** → **47**) bzw. 42 % (**P4**: **57** → **50**). Der Austausch nur einer Guanin- gegen eine Thymin-Base führte zu einem weiteren Signalverlust von 82 % der verbliebenen Emission. Die Pyrenemission wurde am stärksten durch zwei benachbarte Thymin-Basen gelöscht. Die Sonden **49** und **52** konnten nur noch geringfügig vom Puffersignal unterschieden werden. Die **P2**-markierte Sonde **56** hatte im Vergleich zu der analogen **P4**-markierten Sonde **57** ein doppelt so hohes Emissionssignal, wodurch sich die kürzere Linkerlänge bei der Einführung des Fluorophors als gewinnbringender für die Entwicklung einer sensitiven Sonde erwies.

Die Resultate dieser Voruntersuchungen erlaubten eine Einschätzung der geeigneten Sequenzumgebung für das Fluorophor Pyren. Es müssten somit die monomer-

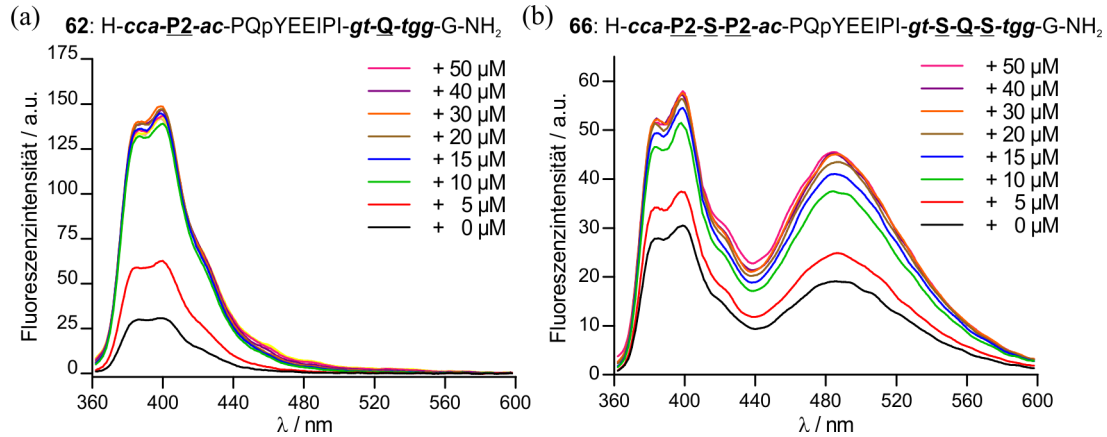


**Abbildung 4.22:** Einfluss der zum Fluorophor benachbarten PNA-Monomere auf die Emission. (a) Signalintensität der unstrukturierten PNA-Peptid-Konjugate bei 400 nm. (b) Fluoreszenzspektren von **P4**-markierten Sonden. Angegeben ist jeweils das *N*-terminale PNA-Segment II. Bedingungen: 2  $\mu$ M Sonde, 20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM NaCl, pH 7.4,  $\lambda_{ex} = 340$  nm.

basierten Sonden **59** und **64** sowie die excimerbasierte Sonde **68** die beste Responsivität bei der Detektion der SH2-Domänen aufweisen. Zu beachten ist jedoch, dass sich die Signalintensität bei der Bindung an ein Protein deutlich unterscheiden kann, da die Sonde dann in gestreckter Form vorliegt und zusätzliche Einflüsse, wie die unmittelbare Nähe zur Proteinoberfläche, eine Signalreduktion verursachen können.

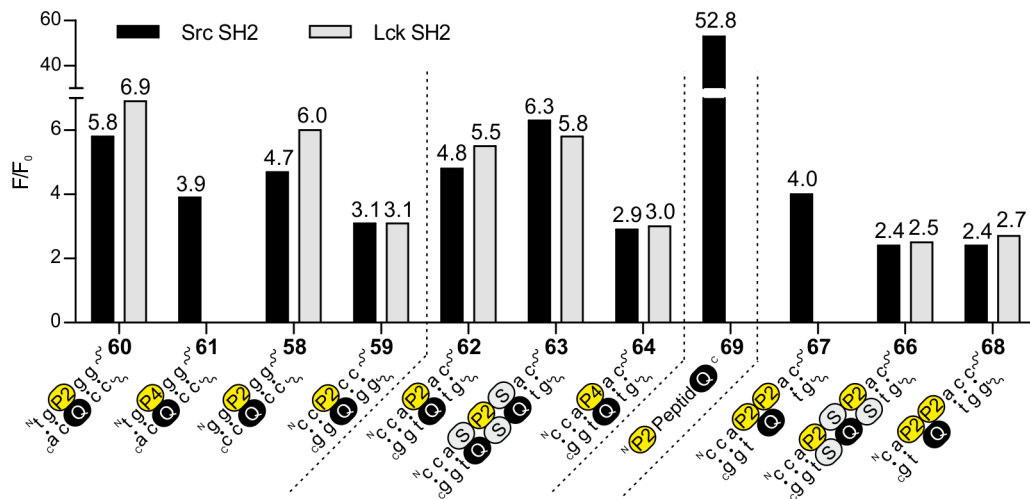
#### 4.4.4 Detektion von SH2-Proteindomänen mit *IS-HPBs*

Um die sensitivsten Sonden für die Detektion der SH2-Domänen zu identifizieren, wurde zunächst deren Responsivität bestimmt, die durch die Höhe des maximalen Signalanstiegs  $F/F_0$  bei Zugabe der Proteindomäne definiert wurde. Zu diesem Zweck wurde eine Stammlösung der Src bzw. Lck SH2-Domäne zu einer 1  $\mu$ M Lösung der SH2-spezifischen Sonden manuell titriert und die Emission spektroskopisch bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm verfolgt. Exemplarisch für die monomerbasierten *IS-HPBs* sind die Spektren der verschiedenen Proteinkonzentrationen mit der Sonde **62** in Abbildung 4.23 a dargestellt. Die Titration eines excimerbasierten *IS-HPBs* ist am Beispiel von Sonde **66** in Abbildung 4.23 b illustriert. Sämtliche Emissionsspektren weisen die für Pyren charakteristischen Monomerbanden bei 380 und 400 nm auf. Bei der Sonde **66** ist eine zusätzliche Excimerbande bei ca. 480 nm erkennbar. Durch erhöhte Konzentrationen an Proteindomäne resultierte ein Anstieg der Pyrenemission bis eine Sättigung mit maximaler Signalintensität erreicht wurde,



**Abbildung 4.23:** Detektion der Src SH2-Domäne. Fluoreszenzspektren der Titration von Sonde (a) **62** und (b) **66** mit Src SH2. Bedingungen: 1  $\mu$ M Sonde, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7.4,  $\lambda_{ex}$  = 340 nm.

was als eine quantitative Bindung bzw. Öffnung des jeweiligen *IS-HPBs* interpretiert wurde. Die Ergebnisse der Titration der untersuchten *IS-HPBs* mit jeweils der Src oder Lck SH2-Domäne sind in Abbildung 4.24 zusammengefasst. Die aufgetragenen Signalanstiege  $F/F_0$  entsprechen dem Quotienten aus der Fluoreszenzintensität bei einer Emissionswellenlänge von 400 nm (monomerbasiert) bzw. 480 nm (excimerbasiert) bei dem maximalen Signal und der Fluoreszenzintensität ohne Proteinzusatz. Die Responsivität der *IS-HPBs* war mit der Lck SH2-Domäne in der Regel höher

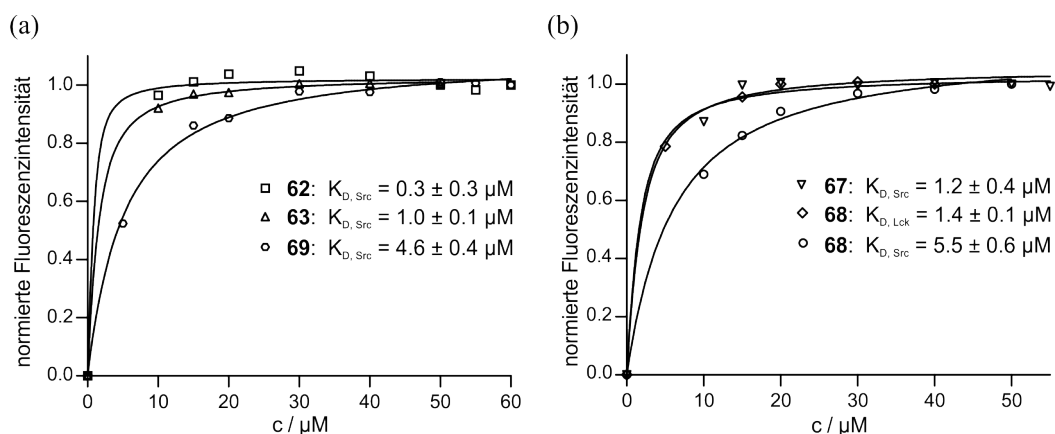


**Abbildung 4.24:** Signalanstiege bei der Detektion von SH2-Domänen. Src SH2 (schwarz) & Lck SH2-Domäne (grau). Bedingungen: 1  $\mu$ M Sonde, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7.4,  $\lambda_{ex}$  = 340 nm,  $\lambda_{em, Monomer}$  = 400 nm,  $\lambda_{em, Excimer}$  = 480 nm. Illustriert sind jeweils die Stammregionen der *IS-HPBs*. Peptid = PQpYEEIPI.



lich im offenen Zustand gestört, wodurch die im Vergleich zu den monomerbasierten *IS-HPBs* kleineren Signalanstiege erklärt werden können. Die excimerbasierten *IS-HPBs* wurden trotz alledem aufgrund ihrer herausragenden Eigenschaften, der großen Stokes-Verschiebung und der langen Lebensdauer der Excimeremission, in fortführenden Untersuchungen mit einbezogen.

Ein weiterer Parameter, der eine gute Sonde auszeichnet, ist eine hohe Affinität zu dem Targetprotein, da dadurch die Wahrscheinlichkeit der Detektion geringster Mengen erhöht wird. Je kleiner der  $K_D$ -Wert einer Sonde, desto sensibler ist sie im Vergleich zu anderen Sonden ähnlicher Responsivität. Aus der Auftragung der Fluoreszenzintensität bei 400 bzw. 480 nm gegen die Konzentration an zuge-setzter Proteindomäne wurde eine Sättigungskurve erhalten und mittels nichtlinea-rer Regression nach Gleichung 6.4 (Kapitel 6.4) der  $K_D$ -Wert der entsprechenden Sonde bzgl. einer Proteindomäne ermittelt. Die Bindungsisothermen sowie die re-sultierenden  $K_D$ -Werte einer Auswahl an Sonden mit den höchsten Affinitäten sind in Abbildung 4.26 dargestellt. Die monomerbasierten *IS-HPBs* **62** und **63** wiesen



**Abbildung 4.26:** Bindungsisothermen und resultierende  $K_D$ -Werte einiger (a) monomer- und (b) excimerbasierter *IS-HPBs*. Einzeldaten wurden aus den Titrationsexperimenten mit der jeweiligen SH2-Domäne erhalten.

sogar höhere Affinitäten zur Proteindomäne als die Peptidsonde **69** auf. Möglicherweise findet zwischen den PNA-Segmenten und der Proteindomäne eine zusätzliche Wechselwirkung statt, die die Bindung der PNA-Peptid-Konjugate verstärkt. Die Bindungsdissoziationskonstanten der Lck SH2-Domäne waren im Schnitt kleiner als die der Src SH2-Domäne, was am Beispiel von Sonde **66** in Abbildung 4.26 b illustriert ist. Dies ließ jedoch keinen Rückschluss darauf zu, dass Sonde **66** zwischen beiden SH2-Domänen diskriminieren kann, da die in dieser Arbeit isolierten SH2-Domänen bereits um mehr als eine Größenordnung verschiedene  $K_D$ -Werte mit dem

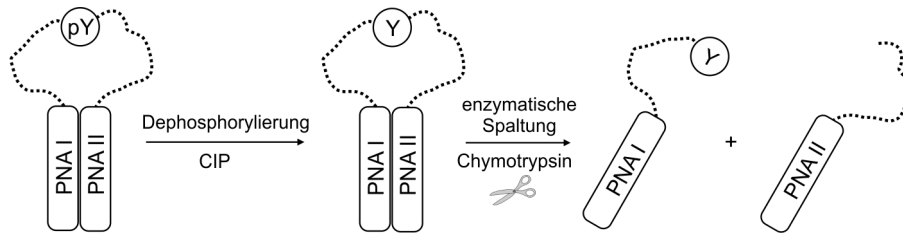
Referenzpeptid FAM-GpYEEIA-NH<sub>2</sub> aufwiesen (siehe Kapitel 4.3, Abbildung 4.15).

Der Zusammenhang der  $K_D$ -Werte und Signalanstiege  $F/F_0$  bei der Titration mit Src SH2 mit den Schmelztemperaturen  $T_M$  einer Auswahl an monomerbasierten *IS-HPBs* ist in Abbildung 4.25 graphisch ersichtlich. Bei Betrachtung der Ergebnisse der **P2**-markierten, pentameren *IS-HPBs* ging eine erhöhte Haarnadelstabilität mit einer verringerten Responsivität und einer schlechteren Affinität einher.

Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse erschienen die monomerbasierten Sonden **62** und **63** als die geeignetsten Werkzeuge für die Detektion der SH2-Domänen. Jedoch konnte der Signalanstieg der Peptidsonde **69** im Wert von 52.8 unter Verwendung der *IS-HPBs* nicht erreicht werden. Um einen Löschmechanismus im proteingebundenen Zustand auszuschließen, sollte eine enzymatische Spaltung der Sonden vorgenommen werden. Die Spaltprodukte diffundieren nach der Prozessierung vom Zielmolekül in die Lösung. Die Pyrenemission sollte somit keiner weiteren Löschung durch das Protein oder dem nah lokalisierten *C*-terminalen PNA-Segment unterliegen.

#### Enzymatische Spaltung der *IS-HPBs* zur Ermittlung des maximalen Fluoreszenzanstiegs

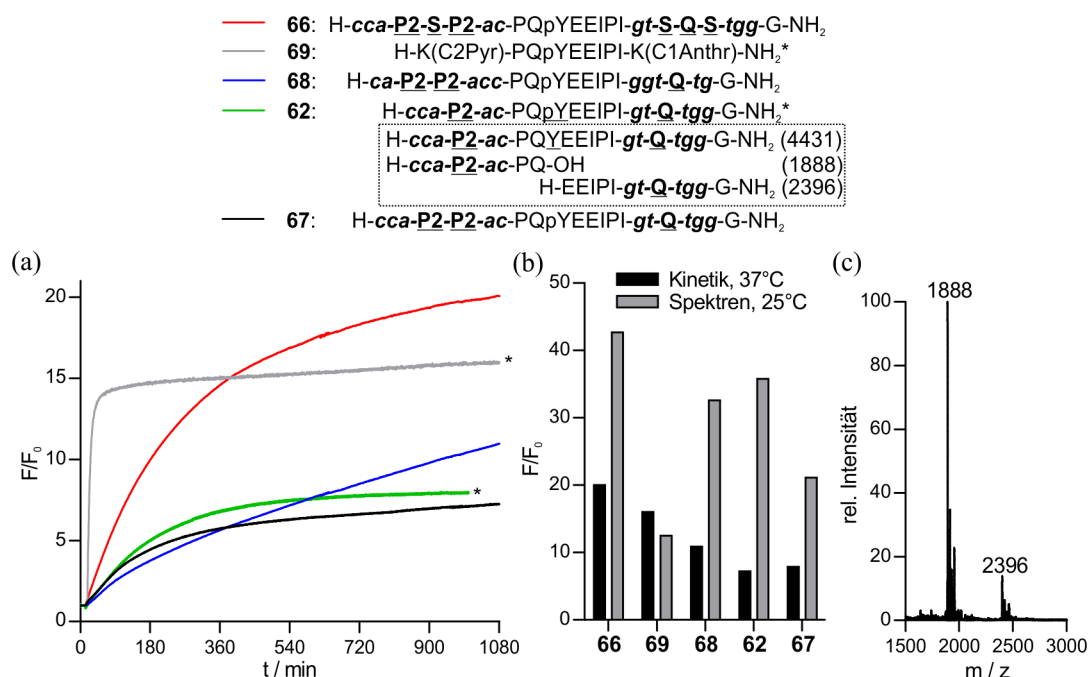
Die maximalen Signalanstiege bei der Titration der SH2-Domänen mit den besten *IS-HPBs* lagen bei 6.3 (**63**, Src) und 6.9 (**60**, Lck). Es wurde vermutet, dass im proteingebundenen Zustand eine Löschung der Pyrenemission durch Elektronentransferprozesse mit dem Quencher-molekül infolge der Annäherung der PNA-Segmente I und II erfolgte, die zu einer geringen Responsivität führten. Um den maximalen Fluoreszenzanstieg der *IS-HPBs* zu ermitteln, sollten die Sonden innerhalb des Peptidsegments enzymatisch gespalten werden. Durch die Inkubation mit der alkalischen Phosphatase (CIP) sollte das Phosphotyrosin der Peptidsequenz in ein Tyrosin transferiert und somit eine Schnittstelle für die Serinprotease Chymotrypsin, die das PNA-Peptid-Konjugat *C*-terminal zum Tyrosin enzymatisch spaltet, generiert werden (Abbildung 4.27). Die intermolekulare Hybridisierung der resultierenden kurzen PNA-Segmente ist ein energetisch nicht favorisierter Prozess und gewährleistet somit die quantitative Separierung der Fluorophoreinheit in PNA I von der Quenchereinheit in PNA II. Dies konnte mithilfe thermischer Denaturierungsexperimente verifiziert werden (Abbildung 4.32a). In ersten Experimenten zeigte sich jedoch, dass bereits bei der Inkubation mit CIP eine quantitative Spaltung erfolgte. Offensichtlich enthielt die aus dem Kälberdarm isolierte Phosphatase eine proteolytische



**Abbildung 4.27:** Konzept der enzymatischen Spaltungsexperimente zur Feststellung der maximalen Fluoreszenzanstiege. CIP = alkalische Phosphatase.

Verunreinigung, die die Sonden über einen langen Zeitraum von bis zu 24 h vollständig spaltete, was zu einer Dehybridisierung der PNA-Stammregion und einem Anstieg des Emissionssignals führte. Diese unspezifische Spaltung wurde zur Einschätzung der maximalen Signalverstärkung der *IS-HPBs* verwendet. Die Proben wurden dabei in einer 1  $\mu$ M Konzentration in Tris-Puffer (20 mM Tris-Cl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8.0) bei 37°C in einer Küvette vorgelegt und nach einer Äquilibrationszeit von 10 min mit 0.7 U CIP versetzt. Die zeitliche Veränderung der Fluoreszenzsignale bei 400 bzw. 480 nm wurde bis zu 18 h lang aufgenommen (Abbildung 4.28 a). Neben den kinetischen Experimenten wurden zusätzlich Spektren einer Probenlösung vor der Zugabe von CIP und nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C bei einer Messtemperatur von 25°C aufgenommen. Diese Methode sollte den Einfluss der Temperatur auf die Signalintensität minimieren. Bei der Prozessierung durch eine Protease wurden wesentlich höhere Fluoreszenzanstiege erzielt als durch die Bindung an eine SH2-Domäne. Der maximale Fluoreszenzanstieg konnte bspw. bei der Sonde **66** von 2.4 (Öffnung nach Sättigung mit Src SH2) auf 42.7 (enzymatische Spaltung bei der Behandlung mit CIP) gesteigert werden (Abbildung 4.28 b). Die Signalanstiege der PNA-Peptid-Konjugate, die über das Verhältnis von  $F_{0min}$  zu  $F_{24h}$  der spektralen Fluoreszenzintensität bei einer Wellenlänge von 400 nm bzw. 480 nm ermittelt wurden, waren deutlich höher als die aus den kinetischen Messungen aufgrund der verminderten Messtemperatur (**66**:  $F/F_{0, \text{Spektren}} = 42.7 \leftrightarrow F/F_{0, \text{Kinetik}} = 20.3$ ) (Abbildung 4.28 b). Die entschieden größeren Signalsteigerungen bei der enzymatischen Spaltung unterstützten die Hypothese, dass die Fluorophoremission im proteingebundenen Zustand weiterhin gelöscht wurde. Die Spaltung der PNA-Peptid-Konjugate und anschließende Separierung der PNA-Segmente I und II erfolgte dabei wesentlich langsamer als die der Peptidsonde **69**. Des Weiteren ist zu bemerken, dass die Peptidsonde **69**, im Vergleich zu den PNA-Peptid-Konjugaten, in der spektralen Analyse der Spaltungsexperimente eine geringere Responsivität aufwies. Der qualitative Nachweis der quantitativen Spaltung des Peptidsegments der PNA-Peptid-





**Abbildung 4.28:** Enzymatische Spaltung bei Behandlung mit CIP. (a) Relative Änderung des Fluoreszenzsignals bei 37°C nach Zugabe von CIP.  $\lambda_{ex} = 340$  nm,  $\lambda_{em}$ , wenn \* = 400 nm (Monomer), sonst  $\lambda_{em} = 480$  nm (Excimer). (b) Vergleich der ermittelten Signalanstiege der Kinetik (37°C) & Spektren (25°C). (c) MALDI-MS-Spektrum der mit CIP für 16 h inkubierten Lösung von Sonde **62**. Bedingungen: 1  $\mu$ M Sonde, 0.7 U CIP, 20 mM Tris-Cl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0, 0.1 % (w/v) BSA. Angegebene Zahlenwerte in g·mol<sup>-1</sup>.

Konjugate durch die Protease wurde jeweils durch Analyse der Inkubationslösungen mittels MALDI-MS erbracht. Das in Abbildung 4.28 c beispielhaft dargestellte Massenspektrum der Sonde **62** zeigt, dass das PNA-Peptid-Konjugat sowohl *N*- als auch *C*-terminal des Tyrosins, nach erfolgter Dephosphorylierung, hydrolytisch gespalten wurde. Aufgrund der identifizierten Massensignale handelte es sich vermutlich bei der proteolytischen Verunreinigung zum einen um die Serinprotease Chymotrypsin, die die Spaltung *C*-terminal zum Tyrosin vornahm. Zum anderen schien eine *N*-terminale Exopeptidase, wie die Tyrosin-Aminopeptidase, präsent gewesen zu sein, die zum detektiertem *C*-terminalen Fragment mit der Masse 2396 g·mol<sup>-1</sup> führte. Beide Enzyme sind u. a. im Darm lokalisiert.

### Résumé der SH2-spezifischen *IS-HPBs*

Auf Basis der Variation der Sequenzumgebung und -länge sowie der Verwendung alternativer Linkerlängen zur Fluorophoranbindung wurde der optimale Aufbau der

*IS-HPBs* mit Pyren und Anthrachinon als Pseudonukleobasen erfolgreich ermittelt. Niedrige Hintergrundfluoreszenzen wurden durch erhöhte Haarnadelstabilitäten erreicht (Abbildung 4.20). Jedoch wirkte dies sich negativ auf die Responsivität bei der Bindung an die SH2-Domänen aus (Abbildung 4.25). Die Ursache blieb bisher ungeklärt. Jedoch wird vermutet, dass eine sequenzspezifische Wechselwirkung der PNA-Segmente mit der Proteindomäne stattfand, wie es für die Src SH2-Domäne bereits beschrieben wurde,<sup>[173]</sup> die zu einer verschieden ausgeprägten Löschung der Fluoreszenzintensität im gebundenen Zustand führte. Die Verwendung eines längeren Linkers für die Fluorophoranbindung resultierte zwar in einer verringerten Hintergrundfluoreszenz, jedoch nur in einer geringen Signalverstärkung. Die größten Signalanstiege (z. B. 6.9-fach mit **60** und Lck SH2) wurden mit PNA-Peptid-Konjugaten mit einer Schmelztemperatur von  $T_M = 36-38^\circ\text{C}$  erreicht, die im Mittelfeld der untersuchten *IS-HPBs* bezogen auf ihre Hintergrundfluoreszenz und Stabilität der PNA-Stammregion lagen. Die Detektion der Src und Lck SH2-Domäne mithilfe der SH2-spezifischen *IS-HPBs* konnte mit einer Affinität im einstelligen  $\mu\text{M}$ -Bereich, jedoch mit einem geringen Signal/Hintergrund-Verhältnis, realisiert werden (Abbildung 4.24, 4.26). Eine Wechselwirkung der PNA-Segmente I und II, untereinander oder mit der Proteinoberfläche, die zu einer verminderten Intensität der Fluorophoremmission im gebundenen Zustand führte, konnte durch die stamminterne Markierung nicht verhindert werden.

Die enzymkatalysierte Spaltung der Sonden resultierte in einer irreversiblen Separierung der PNA-Segmente, wodurch ausnahmslos höhere Fluoreszenzanstiege erhalten werden konnten. Bemerkenswerterweise wiesen die Sonden mit den größten Signalanstiegen bei der Detektion von SH2-Domänen mitunter die schlechtesten Werte bei der enzymatischen Spaltung auf (z. B.  $F/F_0$ , **60** = 14.2). Eine Flankierung der Pyreneinheiten mit  $\alpha$ -Monomeren, die Verwendung von fünf unmodifizierten Basenpaarungen für die Haarnadelbildung sowie die Anbindung des Fluorophors mit einem kurzen Linker erwiesen sich als am besten geeignet für eine maximale Responsivität bei einer quantitativen Spaltung. Besonders die excimerbasierten *IS-HPBs* entfalteten ihr Potential als sensibler Reporter mit den höchsten Signalsteigerungen im enzymatischen Spaltungsexperiment ( $F/F_0$ , **67** = 35.8;  $F/F_0$ , **66** = 42.7), wohingegen bei der Bindung an die Proteindomäne nur minimale Signalverstärkungen detektiert werden konnten (mit Src SH2:  $F/F_0$ , **67** = 4.0;  $F/F_0$ , **66** = 2.4).

Die *IS-HPBs* waren rückschließend besser geeignete Reporter für Proteaseaktivitäten, deren Leistungsfähigkeit als fluorogenes Werkzeug in der Proteinwissenschaft detaillierter an einem Beispiel im Folgekapitel 4.4.5 untersucht wurde.

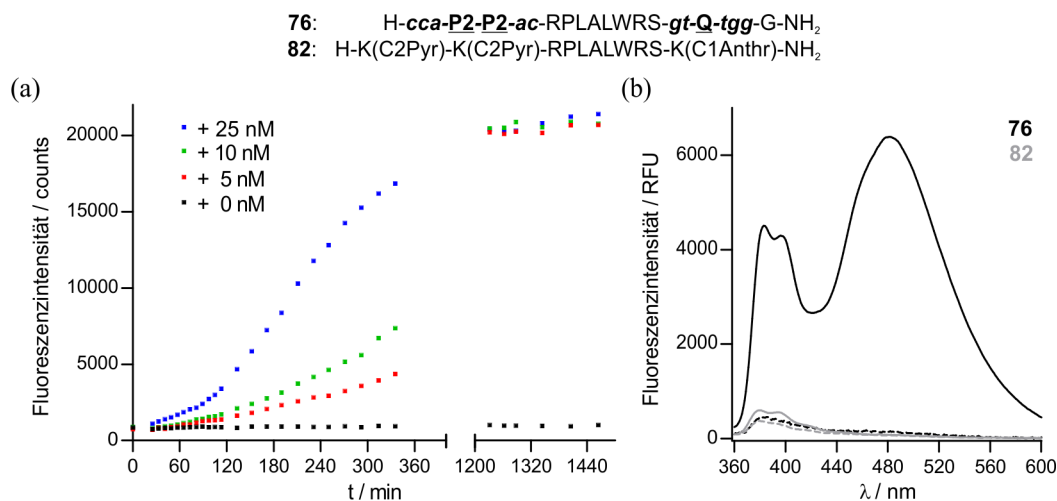
#### 4.4.5 Detektion der Matrix-Metalloprotease 7 mit *IS-HPBs*

Die Entwicklung eines Reporters für die Matrix-Metalloprotease 7 (MMP-7) erfolgte auf Basis der excimerbasierten Sonden **66** und **67** für die SH2-Detektion. In den ersten Untersuchungen wurde die statische Fluoreszenzmessung verwendet, um einen Assay für die MMP-7-Detektion in Puffer zu etablieren. Weiterführende Experimente wurden mit einer zeitaufgelöste Messmethode durchgeführt, die eine Detektion in biologisch, komplexen Medien mit hoher Autofluoreszenz erlaubten.

##### Statische Fluoreszenzmessung

Zunächst wurden statische Fluoreszenzmessungen durchgeführt, um einen Einblick in die Responsivität der synthetisierten MMP-7-spezifischen *IS-HPBs* **70-81** zu gewinnen. Dafür wurde ein Assay entwickelt, der die Detektion mithilfe eines *Plate Readers* in einem 384er-*Well Plate*-Format erlaubte und somit die Voraussetzung für einen hohen Probendurchsatz und die schnelle Überprüfung verschiedener Messbedingungen schaffte.

Zur Identifikation einer für die Charakterisierung der *IS-HPBs* geeigneten Enzymkonzentration wurden die Proben in einer 1  $\mu$ M Konzentration in HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4) vorgelegt. Dem Puffer wurde zur Verbesserung der Löslichkeit das zwitterionische Detergens CHAPS zugesetzt, das sich in Vorexperimenten für diese Zwecke als nützlich erwies. Nach Aufnahme des F<sub>0</sub>-Wertes bei einer Anregung von 355 nm wurden verschiedene Mengen an MMP-7 (0, 5, 10 und 25 nM) bei 25 °C zugegeben. Der zeitliche Verlauf der Excimeremission wurde anschließend bei 460 nm und 37 °C bis zu 24 h verfolgt (Abbildung 4.29 a, am Beispiel von Sonde **76**). Die enzymatische Spaltung der Sonden war durch einen deutlichen Anstieg der Excimeremission gekennzeichnet, die nach dem Erreichen der maximalen Signalintensität bis zu 24 h konstant blieb. Eine Konzentration von 25 nM MMP-7 erschien zweckmäßig für die Untersuchung der proteasespezifischen *IS-HPBs*, da das Maximum des Fluoreszenzsignals in einem akzeptablen, zeitlichen Rahmen erreicht wurde. Eine Reduktion der Enzymkonzentration sowie die Erniedrigung der Temperatur auf 30 °C (nicht gezeigt) resultierten in einer erheblichen Verlangsamung der quantitativen Spaltung und wurden als nicht sinnvoll bewertet. In den ersten Versuchen hatte die allmähliche Erwärmung der Reaktionsmischung auf die Messtemperatur (25  $\rightarrow$  37 °C) einen nichtlinearen Anstieg der Auftragung der Fluoreszenzintensität gegen die Zeit zur Folge, der die Bestimmung von Spaltungsgeschwindigkeiten verfälschte (25 nM MMP-7 in Abbildung

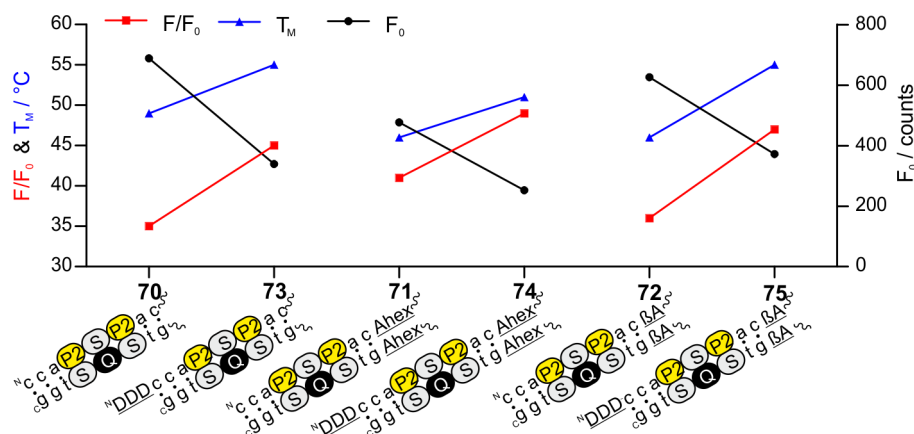


**Abbildung 4.29:** Detektion von MMP-7 mit Sonde **76**. (a) Änderung des Fluoreszenzsignals bei 37 °C nach Zugabe verschiedener Konzentrationen an MMP-7,  $\lambda_{ex} = 355$  nm,  $\lambda_{em} = 460$  nm. (b) Fluoreszenzspektren nach 24 h mit (—) & ohne (---) Zusatz von 25 nM MMP-7, Vergleich mit Peptidsonde **82**,  $\lambda_{ex} = 340$  nm, 25 °C. Bedingungen: 1  $\mu$ M Sonde, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4.

4.29 a). Es wurde somit zukünftig die Enzymzugabe bei 37 °C auf einer temperierten Platte vorgenommen, was in einem linearen Anstieg zu Beginn resultierte. Die Fluoreszenzintensitäten der Proben ohne Enzymzusatz sowie des Puffers mit Enzymzusatz wurden ebenfalls über denselben Zeitraum verfolgt, um den Einfluss der Verdunstung und die Stabilität der Hintergrundsignale zu beurteilen (schwarze Datenpunkte in Abbildung 4.29 a). Die Sonden zeigten keine Präzipitationsneigung im gewählten Puffer.

In Kombination mit den Messungen im kinetischen Modus wurden Spektren bei 25 °C zu Beginn und nach einer Inkubation über 24 h aufgezeichnet (Abbildung 4.29 b, am Beispiel von Sonde **76**). Die Spektren der *IS-HPBs* mit Enzymzugabe wiesen deutliche Excimerbanden im Gegensatz zur intakten Probe auf, was im dargestellten Fall mit einem 48-fachen Signalanstieg einherging. Zum Vergleich wurde die Peptidsonde **82** untersucht, die ebenfalls zwei Pyreneinheiten und einen anthrachinonbasierten Quencher enthielt, jedoch keine für die Haarnadelbildung notwendigen C- und N-terminalen PNA-Segmente. Die Emissionsintensität der Sonde **82** bei 480 nm blieb sowohl in der kinetischen, als auch in der spektralen Untersuchung unverändert (Abbildung 4.29 b). Dies unterstreicht die Notwendigkeit des Haarnadeldesigns für eine Proteasedetektion mit hoher Responsivität mittels Excimeremission.

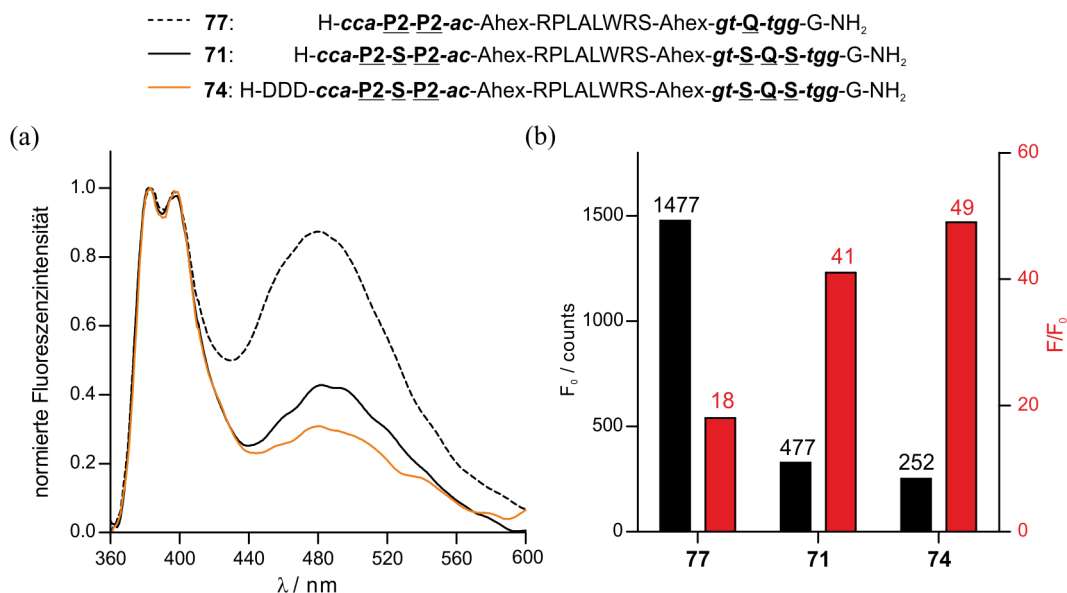
Mithilfe der optimierten Messbedingungen wurden die proteasespezifischen *IS-HPBs* **70-81** mit dem zentralen Peptidsegment RPLALWRS auf ihre Responsivität gegenüber der Anwesenheit von MMP-7 geprüft. Die aufgedeckten Korrelationen zwischen dem Signalanstieg  $F/F_0$ , der Schmelztemperatur  $T_M$  und der Hintergrundfluoreszenz  $F_0$  sind in Abbildung 4.30 am Beispiel der *IS-HPBs* **70-75** mit *Spacer*-



**Abbildung 4.30:** Korrelation der Signalanstiege mit 25 nM MMP-7 nach 24-stündiger Inkubation (rot), der Hintergrundsignale (schwarz) mit der Schmelztemperatur (blau) der *IS-HPBs* mit *Spacer*-Einheiten. Illustriert sind jeweils die Stammregionen der *IS-HPBs*. Peptid = RPLALWRS.

Einheiten illustriert. Die Sonden **76-81** ohne *Spacer*-Einheiten wiesen dieselben Tendenzen auf und sind aus diesem Grunde nicht explizit aufgeführt. Analog zu den SH2-spezifischen Sonden ging eine erhöhte Haarnadelstabilität jeweils mit einer Reduktion des Hintergrundsignals der Sonde einher. Daraus resultierte, im Gegensatz zu den bisher untersuchten Sonden, ein Anstieg des ermittelten Signal/Hintergrund-Verhältnisses bei der Wechselwirkung mit dem Zielmolekül, die nun auf der Spaltung der Sonde und nicht auf eine Bindung beruhte (vgl. Abbildung 4.25). So konnte für die Sonde **70** eine Schmelztemperatur von  $T_M = 49^\circ\text{C}$  gemessen werden, was zu einer Hintergrundfluoreszenz von  $F_0 = 688$  und einem Signalanstieg von  $F/F_0 = 35$  führte. Die bauähnliche, jedoch, aufgrund der *N*-terminalen Modifikation mit einer Schmelztemperatur von  $T_M = 55^\circ\text{C}$ , stabilere Sonde **73** wies im direkten Vergleich eine deutlich geringe Hintergrundfluoreszenz von  $F_0 = 339$  auf, was wiederum eine größere Signalverstärkung bei Anwesenheit des MMP-7 von  $F/F_0 = 45$  nach sich zog.

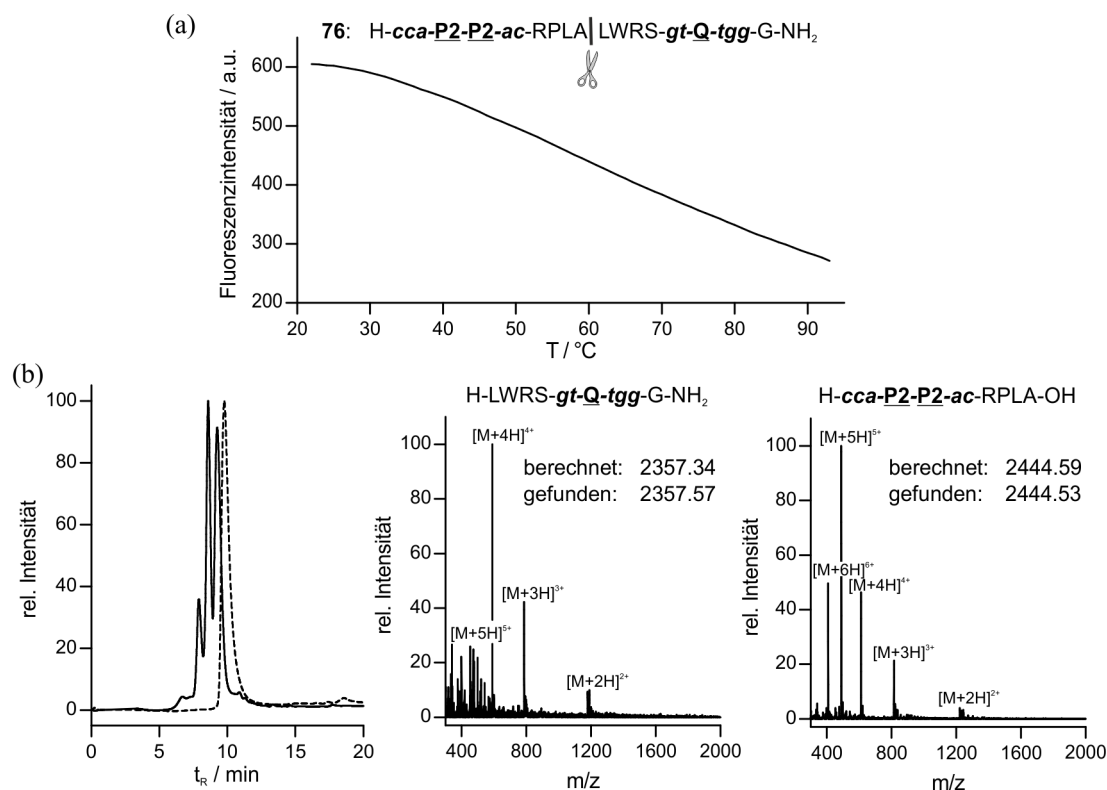
Das Ausmaß mit der die Excimerbildung im freien Zustand unterdrückt und somit das Hintergrundsignal minimiert wird, kann durch das Verhältnis der Monomer- zu Excimeremission beschrieben werden. Je größer dieser Zahlenwert ist, desto wirksamer erfolgt die Interkalation der Quenchereinheit zwischen den beiden Pyrenein-



**Abbildung 4.31:** Reduktion des Hintergrundsignals und Erhöhung der Responsivität von MMP-7-spezifischen *IS-HPBs*. (a) Fluoreszenzspektren Ahex-modifizierter *IS-HPBs*, normiert auf die maximale Monomeremission bei 380 nm. (b) Hintergrundfluoreszenz & Signalanstiege nach 24 h Inkubation mit 25 nM MMP-7. Bedingungen: 1  $\mu$ M Sonde, 25 °C, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4.

heiten. Die in Abbildung 4.31 a dargestellten, auf die maximale Monomeremission bei 380 bzw. 400 nm normierten Fluoreszenzspektren veranschaulichen, dass infolge der Stabilisierung der Haarnadelstruktur von Sonde **77** durch die Einführung eines *Spacers* ( $\rightarrow$  **71**) und die zusätzliche *N*-terminale Modifikation ( $\rightarrow$  **74**), das Verhältnis von 1.1 (**77**) über 2.2 (**71**) auf 3.2 (**74**) gesteigert werden konnte. Die Wechselwirkung der Pseudonukleobasen wurde durch die Variation der Sequenzumgebung bedeutend verstärkt, was mit einer Reduktion des Hintergrundsignals und einer Maximierung des Signalanstiegs verbunden war (Abbildung 4.31 b). Die Sonde **74** besaß mit  $F_0 = 252$  die niedrigste Hintergrundfluoreszenz aller untersuchten MMP-7-spezifischen *IS-HPBs* und war somit sogar im Intensitätsbereich der Puffersignale. Dies führte zu einer Verbesserung der Fluoreszenzrespons zu einem Maximalwert von  $F/F_0 = 49$ .

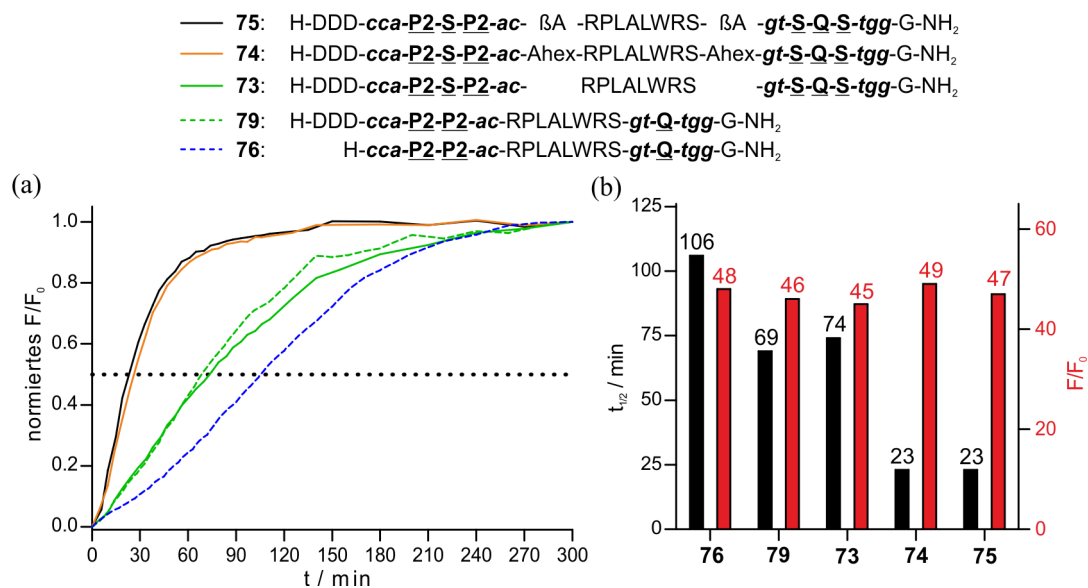
Mithilfe eines thermischen Denaturierungsexperiments mit den Spaltprodukten der Sonde **76** ließ sich nachweisen, dass die intermolekulare Hybridisierung der resultierenden kurzen PNA-Segmente ein energetisch nicht favorisierter Prozess ist (Abbildung 4.32 a). Die vergleichsweise hohe Anfangsintensität der Excimeremission bei 480 nm sank mit zunehmender Temperatur, was auf eine fehlende Hybridisie-



**Abbildung 4.32:** Untersuchung der Lösung von Sonde **76** nach der Inkubation mit MMP-7 mittels (a) temperaturabhängiger Fluoreszenzspektroskopie, 25–90 °C,  $\lambda_{ex} = 340$  nm,  $\lambda_{em} = 480$  nm und (b) HPLC-MS: HPLC-Spuren bei 260 nm vor (---) und nach (—) Inkubation mit MMP-7, ESI-MS-Spektren vom ersten und zweiten HPLC-Peak mit entsprechenden dekonvolvierten Massen in g·mol<sup>-1</sup>.

nung zurückzuführen ist und durch die erhöhte Stoßdeaktivierung infolge gesteigerter Brownscher Molekularbewegung verursacht wird. Der qualitative Nachweis der Spaltung wurde jeweils mittels HPLC-MS-Analyse der Inkubationslösung erbracht (am Beispiel von Sonde **76** in Abbildung 4.32 b).

Ausschlaggebend für einen praktisch nützlichen Reporter für Proteaseaktivitäten ist, neben einer großen Responsivität, eine schnelle quantitative Umsetzung der Sonde, die einen hohen Probendurchsatz in der späteren Anwendung ermöglicht. Als Parameter für einen Vergleich der *IS-HPBs* wurde die Zeit bei der halbmaximalen Spaltung ( $t_{1/2}$ ) gewählt. In Abbildung 4.33 wird ersichtlich, dass durch die *N*-terminale Modifikation die Spaltung erheblich beschleunigt werden konnte ( $t_{1/2}$ , **76** = 106 min →  $t_{1/2}$ , **79** = 69 min). Die Ursache konnte bisher nicht geklärt werden. Der Einbau von *Spacer*-Einheiten hatte erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse. Die Erhöhung der Flexibilität des

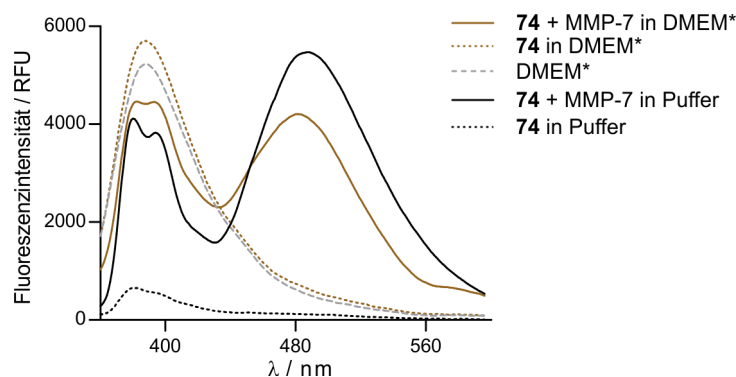


**Abbildung 4.33:** Detektion von MMP-7 in Puffer. (a) Zeitliche Veränderung des normierten Signalanstiegs bei 37 °C,  $\lambda_{ex} = 355$  nm,  $\lambda_{em} = 460$  nm. (b) Ermittelte halbmaximale Spaltungszeiten & Signalanstiege der Fluoreszenzspektren bei 25 °C nach 24 h Inkubation,  $\lambda_{ex} = 340$  nm,  $\lambda_{em} = 480$  nm. Bedingungen: 1  $\mu$ M Sonde, 25 nM MMP-7, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4.

Peptidsegments durch die Flankierung mit Linkereinheiten, wie Ahex oder  $\beta$ A, führte infolge der erleichterten Zugänglichkeit der Protease zu einer deutlichen Beschleunigung des Spaltungsprozesses. Die halbmaximale Spaltungszeit konnte entsprechend von  $t_{1/2}$ , **73** = 74 min auf  $t_{1/2}$ , **74** = 23 min bzw.  $t_{1/2}$ , **75** = 23 min, ohne einen Verlust an Responsivität, reduziert werden (Abbildung 4.33 b).

Unter Verwendung der schnellsten und responsivsten Sonden für die MMP-7-Detektion im Puffer sollte die Präsenz von MMP-7 in einer komplexen, biologischen Matrix nachgewiesen werden. Erste Experimente mit der Sonde **74** in dem Zellmedium DMEM\* offenbarten, dass die erreichbare Signalverstärkung von 5 um ein Vielfaches kleiner als im wässrigen Puffer mit  $F/F_0 = 49$  war (Abbildung 4.34). Die Ursache war die hohe Autofluoreszenz der Zellmediumbestandteile, wie diverser Wachstumsfaktoren im Kälberserum, im Wellenlängenbereich 360 bis 500 nm bei einer Anregung im nahen UV-Bereich. Das Fluoreszenzsignal der Sonde **74** wurde durch die des Zellmediums überlagert, was die statische Fluoreszenzmessung in diesem Fall als unbrauchbar kennzeichnete.





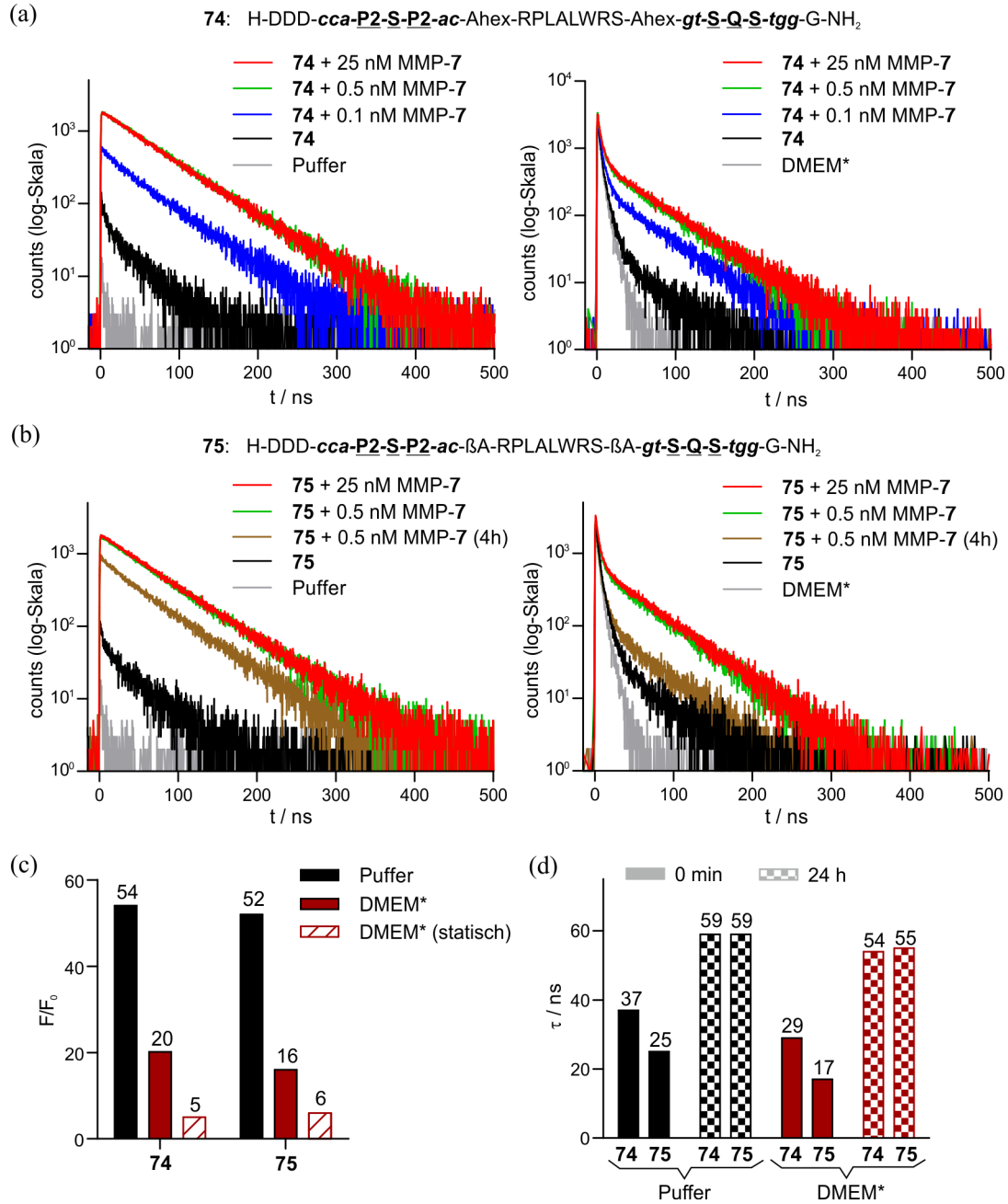
**Abbildung 4.34:** Statische Fluoreszenzmessung von **74** in Puffer und DMEM\*. Bedingungen:  $1\text{ }\mu\text{M}$  Sonde,  $25\text{ nM}$  MMP-7,  $\lambda_{ex} = 340\text{ nm}$ ,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , Puffer =  $10\text{ mM}$  HEPES,  $150\text{ mM}$  NaCl,  $5\text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.05\text{ }\%$  (w/v) CHAPS, pH 7.4. DMEM\* = DMEM mit  $10\text{ }\%$  FCS &  $1\text{ }\%$  Antibiotika.

### Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung in Puffer und Zellmedium

Die lange Lebensdauer der Pyrenexcimeremission im ns-Bereich eröffnete die Möglichkeit zeitaufgelöste Messungen durchzuführen. Die Untersuchung der Sonden **74** und **75**, die sich in der statischen Betrachtung durch minimale Spaltungszeiten und höchste Signalanstiege bei Anwesenheit des Enzyms auszeichneten, wurde mit der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) umgesetzt.

Zu Beginn wurden die Sonden **74** und **75** in dem mit  $10\text{ }\%$  fötalem Kälberserum (FCS) und  $1\text{ }\%$  Antibiotika komplettierten Zellmedium DMEM (DMEM\*) untersucht. Als Kontrolle wurden parallel Messungen im bereits bekannten HEPES-Puffer vorgenommen. Die Sonden wurden in einer  $1\text{ }\mu\text{M}$  Konzentration eingesetzt und zunächst geprüft, ob eine Unterscheidung der Sonden- von den Matrixsignalen mit den angewendeten Methodenparametern möglich ist. In Abbildung 4.35 a & b sind die entsprechenden Histogramme nach einer Inkubationszeit von  $24\text{ h}$  dargestellt. Die Signale des Puffers und Zellmediums (graue Linie) klangen wesentlich schneller als die Sondensignale ab. Des Weiteren war ein signifikanter Unterschied der Abklingkurven mit (z. B. rote Linie mit  $25\text{ nM}$  MMP-7) und ohne Enzymzusatz (schwarze Linie) erkennbar.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten wurde das Integral im Zeitintervall von  $50\text{--}250\text{ ns}$  gewählt, da in diesem Bereich die Signale der Matrix vollständig abgeklungen waren und die der Sonden immer noch verwendbare Größenordnungen aufwiesen. Aus dem Quotienten der Signalintensitäten mit (F) und ohne MMP-7-Zusatz ( $F_0$ ) konnten die  $F/F_0$ -Werte berechnet werden (Abbildung 4.35 c). Mithilfe der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung wurden höhere Signalanstiege erzielt als

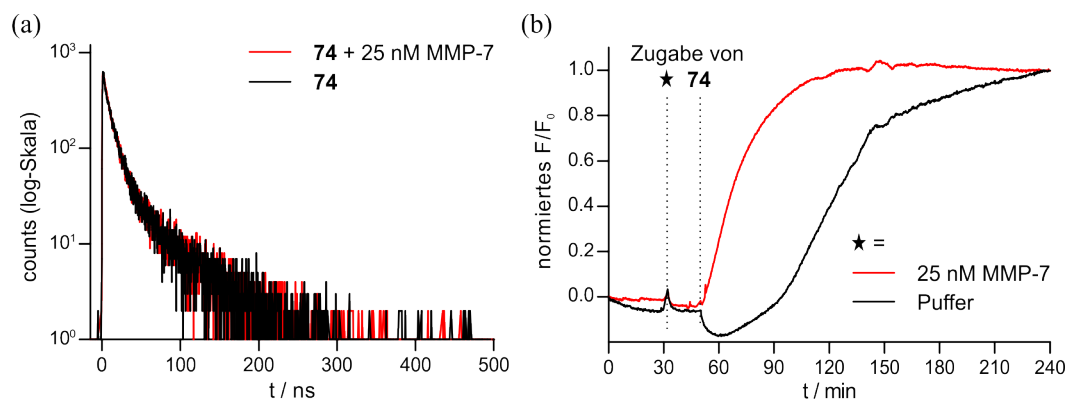


**Abbildung 4.35:** TCSPC-Histogramme nach 24 h Inkubation der Sonden (a) **74** & (b) **75** mit und ohne MMP-7-Zusatz in Puffer (links) & DMEM\* (rechts). (c) Signalanstiege mit 25 nM MMP-7 unter Berücksichtigung des Zeitintervalls 50-250 ns. (d) Fluoreszenzlebensdauer in Puffer & DMEM\* der intakten (0 min) & der gespaltenen Probe (24 h). Bedingungen: 1  $\mu$ M Sonde,  $\lambda_{ex}$  = 280 nm,  $\lambda_{em}$  = 480 nm, 25 °C, Puffer = 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4, DMEM\* = DMEM mit 10 % FCS & 1 % Antibiotika.

mit der statischen Messmethode. In weiterführenden Experimenten wurde die Enzymkonzentration bis auf 0.1 nM reduziert, um eine Detektionsgrenze für MMP-7 zu bestimmen. Nach 24 h wurden die Sonden **74** und **75** quantitativ von 0.5 nM MMP-7 in Puffer und DMEM\* gespalten (Abbildung 4.35 a, b). Bei kleineren Konzentrationen (0.1 nM MMP-7) sowie kürzeren Inkubationszeiten von 4 h konnte MMP-7 mit einer verminderten Signalintensität detektiert werden (blaue und braune Linie in Abbildung 4.35 a, b). Durch exponentielle Regression der jeweiligen Abklingkurven konnte zusätzlich die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  der intakten und gespaltenen Sonden ermittelt werden (Abbildung 4.35 d). Aufgrund der enzymatischen Spaltung wurde die Löschung der Excimeremission durch die interkalierte Anthrachinoneinheit aufgehoben und führte zu einer erheblichen Verlängerung ihrer Lebensdauer in den vermessenen Medien, wodurch eine eindeutige Differenzierung zur intakten Probe ermöglicht wurde (DMEM\*, **75**:  $\tau_{\text{intakt}} = 17 \text{ ns} \leftrightarrow \tau_{\text{gespalten}} = 55 \text{ ns}$ ). Je effizienter der Energietransfer zwischen den Chromophoren war, desto kürzer war die ermittelte Fluoreszenzlebensdauer der intakten Probe, da der angeregte Zustand schneller entvölkert wurde. So wies die intakte Sonde **75** mit einer höheren Haarnadelstabilität kleinere  $\tau$ -Werte auf als die Sonde **74** mit einem Ahex-Linker (**75**:  $T_M = 55^\circ\text{C}$ ,  $\tau_{\text{Puffer}} = 25 \text{ ns} \leftrightarrow$  **74**:  $T_M = 51^\circ\text{C}$ ,  $\tau_{\text{Puffer}} = 37 \text{ ns}$ ). Nach der quantitativen Spaltung waren beide Sonden denselben Umgebungsbedingungen ausgesetzt, wodurch der Unterschied aufgehoben wurde und die  $\tau$ -Werte der Sonden übereinstimmten.

### Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessung im Humanserum

Im Anschluss an den erfolgreichen Nachweis von MMP-7 im Zellmedium sollte die Komplexität der biologischen Matrix in weiterführenden Experimenten erhöht werden, um den realen Messbedingungen in der diagnostischen Anwendung gerecht zu werden. In klinischen Studien erfolgt die Bestimmung des Expressionslevels von MMP-7 im Humanserum, um die Progression von Dickdarmkrebs einzuschätzen und Aussagen über die Überlebenschancen zu treffen.<sup>[54]</sup> Dabei wird eine 1 nM Konzentration als kritischer Grenzwert betrachtet, der auf metastasierenden Krebs hindeutet. Die ersten Experimente im Humanserum wurden mit der Sonde **74** und einer 25 nM Enzymkonzentration durchgeführt. Nach einer Inkubation im unverdünnten Humanserum bei  $37^\circ\text{C}$  konnten die erhaltenen Histogramme der Blindprobe (schwarze Linie, ohne MMP-7) nicht von der Vergleichsprobe (rote Linie, mit 25 nM MMP-7) differenziert werden (Abbildung 4.36 a). Statische Fluoreszenzmessungen im kinetischen Modus offenbarten, dass die Sonde **74** auch ohne MMP-7-Zusatz

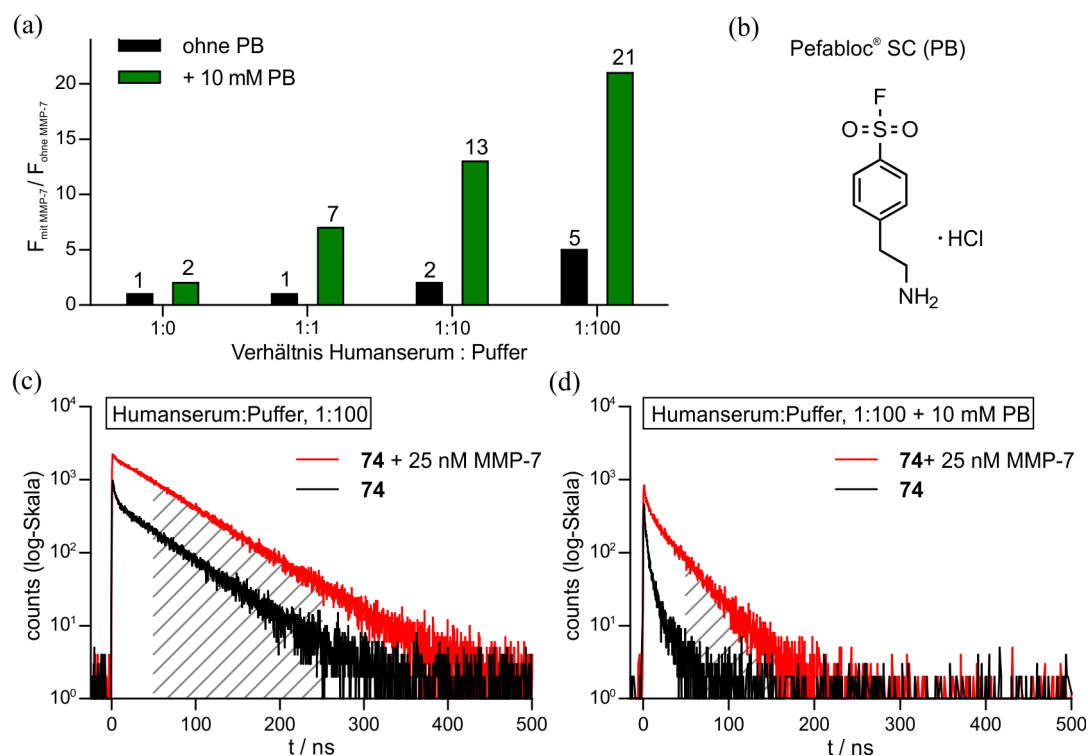


**Abbildung 4.36:** Detektion von MMP-7 mit Sonde **74** im unverdünnten Humanserum. (a) TCSPC-Histogramme nach 24 h Inkubation,  $\lambda_{ex} = 280$  nm,  $25^\circ\text{C}$ . (b) Zeitliche Änderung des normierten Signalanstiegs der Blind- & Vergleichsprobe,  $\lambda_{ex} = 340$  nm,  $37^\circ\text{C}$ . Bedingungen:  $1\ \mu\text{M}$  Sonde,  $25\ \text{nM}$  MMP-7, Puffer =  $10\ \text{mM}$  HEPES,  $150\ \text{mM}$  NaCl,  $5\ \text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.05\ \%$  (w/v) CHAPS, pH 7.4,  $\lambda_{em} = 480$  nm.

durch eine bisher unbekannten Reaktion gespalten wurde (Abbildung 4.36 b). Der Signalanstieg infolge der enzymatischen Hydrolyse durch MMP-7 war jedoch wesentlich schneller, wodurch sich ein Zeitfenster von ca. 60 min eröffnete, bei dem die spezifische Spaltung nahezu quantitativ verlief und der durch die unbekannte Reaktion verursachte Anstieg vernachlässigbar klein war. In folgenden Experimenten sollten somit sämtliche Proteaseaktivitäten nach 60 min durch eine 5-minütige Lagerung der Proben bei  $60^\circ\text{C}$  und eine anschließende, schnelle Abkühlung auf  $0^\circ\text{C}$  unterbunden werden. Dieser Ansatz scheiterte jedoch, da nach wie vor kein Unterschied zur Blindprobe ersichtlich war (nicht gezeigt).

Weitere Versuche basierten auf der Verdünnung des Humanserums mit Puffer in verschiedenen Mischungsverhältnissen und den Zusatz des Serinproteasehemmers Pefabloc® SC (PB, Abbildung 4.37 b). Die 24-stündige Probeninkubation bei  $37^\circ\text{C}$  erfolgte jeweils mit und ohne Zusatz von  $10\ \text{mM}$  PB sowie mit und ohne Zusatz von  $25\ \text{nM}$  MMP-7. In Abbildung 4.37 sind jeweils die aus dem Zeitintervall 50-250 ns berechneten Signalunterschiede zwischen Blind- & Vergleichsprobe sämtlicher Mischungsverhältnisse sowie die zugrundeliegenden Abklingkurven von Humanserum:Puffer = 1:100 dargestellt. Dabei konnte durch eine Verdünnung des Humanserums mit Puffer im Verhältnis 1:100 die Vergleichsprobe mit Faktor 5 von der Blindprobe differenziert werden. Der Zusatz des Proteasehemmers erhöhte darüber hinaus die Unterscheidbarkeit auf Faktor 21, führte allerdings zu einer wesentlich kürzeren Fluoreszenzlebensdauer der Excimeremission (vgl. Abbildung 4.37 c & d).

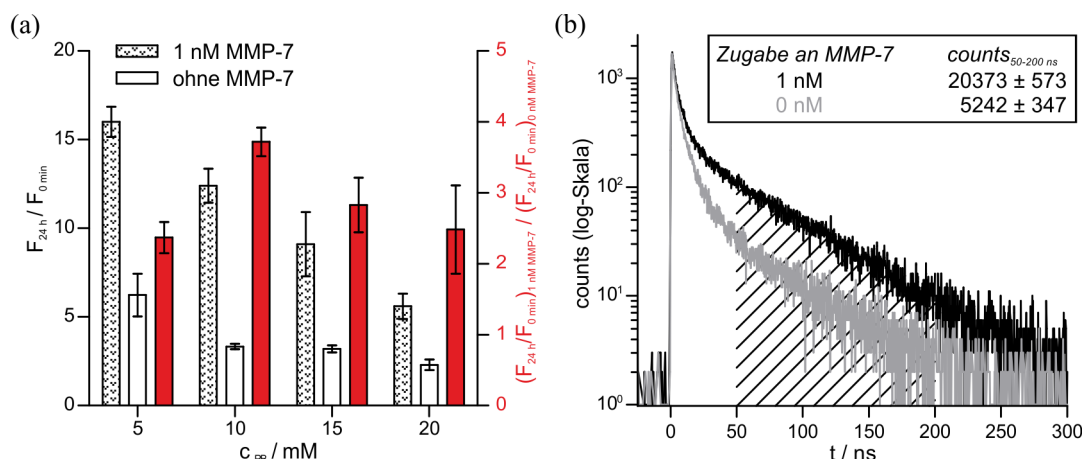
#### 4.4 Erhöhung der Responsivität durch alternative Markierung der PNA-Peptid-Konjugate



**Abbildung 4.37:** Optimierte Detektion von MMP-7 mit Sonde **74** im Humanserum. (a) Signalunterschiede zwischen der Blind- & Vergleichsprobe bei den verschiedenen Mischungsverhältnissen mit Puffer. (b) Struktur des Proteasehemmers Pefabloc® SC. (c) & (d) TCSPC-Histogramme nach 24 h Inkubation. Bedingungen:  $1 \mu\text{M}$  Sonde,  $25 \text{ nM}$  MMP-7,  $25^\circ\text{C}$ , Puffer =  $10 \text{ mM}$  HEPES,  $150 \text{ mM}$  NaCl,  $5 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $0.05 \%$  (w/v) CHAPS,  $\text{pH } 7.4$ ,  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$ .

Die unbekannte Sondenspaltung konnte somit erfolgreich unterdrückt werden.

Obwohl der größte Signalunterschied zwischen Blind- und Vergleichsprobe mit einem Mischungsverhältnis von 1:100 erzielt wurde, erwies sich diese Verdünnung der Gesamtlösung bei der Detektion der als kritisch bewerteten  $1 \text{ nM}$  MMP-7-Konzentration als zu hoch, um eine quantitative Spaltung innerhalb von 24 h zu gewährleisten. Aufgrund dessen wurden konzentriertere Proben mit einem Mischungsverhältnis von 1:10 verwendet. Um den besten Signalunterschied zwischen Blind- und Vergleichsprobe zu identifizieren, wurden verschiedene PB-Konzentrationen getestet (Abbildung 4.38 a). Das beste Resultat mit einem 4-fachen Signalunterschied zwischen Blind- und Vergleichsprobe wurde mit einer Proteasehemmerkonzentration von  $c_{\text{PB}} = 10 \text{ mM}$  erzielt. Die zugehörigen Abklingkurven sowie die berechneten Intensitäten unter Berücksichtigung des Zeitintervalls 50-200 ns sind in Abbildung 4.38 b dargestellt. Eine reduzierte Menge an Proteasehemmer konnte die Spaltung in



**Abbildung 4.38:** Detektion von 1 nM MMP-7 mit der Sonde **74** im Humanserum. (a) Signalanstiege & -unterschiede zwischen Blind- & Vergleichsprobe. (b) TCSPC-Histogramme nach 24 h Inkubation. Einschub: Mittelwerte der berechneten Integrale. Bedingungen: 1  $\mu\text{M}$  Sonde,  $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 480 \text{ nm}$ , 25 °C, Mischungsverhältnis 1:10, Puffer = 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4. Dreifachbestimmung, angegeben sind jeweils die Standardabweichungen.

der Blindprobe nicht ausreichend unterdrücken, wodurch ein kleinerer Unterschied zur Vergleichsprobe entstand. Bei höheren Konzentrationen konnte dieses zwar bewerkstelligt werden, jedoch zogen kleinere Intensitäten der Vergleichsprobe einen geringeren Signalunterschied nach sich.

### Résumé der MMP-7-spezifischen *IS-HPBs*

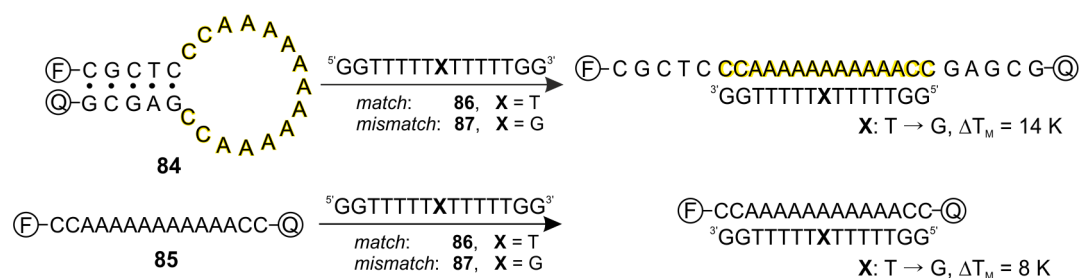
Die Detektion von MMP-7 in Puffer, Zellmedium und Humanserum konnte erfolgreich durch die Verwendung von *IS-HPBs* mit der zentralen Erkennungssequenz RPLALWRS umgesetzt werden. Auf Basis einer pentameren, unmodifizierten Basenpaarung in der PNA-Stammregion und einer Flankierung zweier, benachbarter Pyreneinheiten mit  $\alpha$ -PNA-Monomeren wurden responsive Sonden generiert, die die Anwesenheit der Protease in einem auf statischer Fluoreszenzmessung basierenden Assay im 384er *Well Plate*-Format in einem Puffer anzeigten. Die Erhöhung der Haarnadelstabilität, durch eine *N*-terminale Modifikation mit drei Aspartateinheiten und/oder die Einführung von *Spacer*-Einheiten, um einer möglichen extrahelikalen Anordnung der Chromophore entgegenzuwirken, resultierte in einem minimierten Hintergrundsignal. Die Löschung der Excimeremission durch den Quencherbaustein erfolgte dabei nicht nur aufgrund einer effizienten Energieübertragung, sondern auch durch die Interkalation zwischen den Fluorophoreinheiten, die eine Excimerbildung

verhinderte. Die responsivste Sonde **74**, die durch eine *N*-terminale Modifikation und den Einbau eines *Spacers* gekennzeichnet war, erzielte einen Signalanstieg von  $F/F_0 = 49$ , der eine Langzeitstabilität über 24 h aufwies. Die Steigerung der Flexibilität des Peptidsegments infolge des Einbaus von Linkereinheiten, wie Amino-hexansäure oder  $\beta$ -Alanin, führte zu einer erheblichen Beschleunigung der Spaltungsgeschwindigkeit. Die Sonden **74** und **75** konnten in einer  $1\ \mu\text{M}$  Konzentration innerhalb von nur 60 min von dem proteolytischen Target (25 nM MMP-7) quantitativ im wässrigen Puffer gespalten werden.

Mithilfe der excimerbasierten Sonden **74** und **75** gelang es weiterhin in zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen eine geringe MMP-7-Konzentration von 0.1 nM nach 24 h und 0.5 nM nach nur 4 h in dem stark autofluoreszenten Medium DMEM\* mit einer  $1\ \mu\text{M}$  Sondenkonzentration nachzuweisen. Die Eignung als fluorogenes Werkzeug in der diagnostischen Anwendung wurde anhand von Untersuchungen im Humanserum geprüft. Nach einer Optimierung der Messbedingungen konnte mit der Sonde **74** ( $1\ \mu\text{M}$ ) eine 1 nM MMP-7-Konzentration im Humanserum detektiert werden, was einem kritischen Grenzwert für die Progression von Dickdarmkrebs entspricht.<sup>[54]</sup> Eine unerwünschte Spaltung durch Serinproteasen, die im Serum allgegenwärtig sind, wurde dabei wirksam durch die Verdünnung des Serums mit Puffer und dem Zusatz von einem Serinproteasehemmer unterdrückt. Der Unterschied zwischen der Blind- und Vergleichsprobe konnte dadurch maximiert werden.

## 4.5 Thermodynamische Untersuchung der PNA-Peptid-Konjugate

Bei der Untersuchung von Nukleinsäuren mit DNA-basierten *Molecular Beacons* (MBs) konnte von Bonnet *et al.* unter Verwendung thermischer Denaturierungsexperimente und thermodynamischer Analysemethoden gezeigt werden, dass strukturierte Sonden eine höhere Spezifität bzgl. ihres Komplementärstranges aufweisen als unstrukturierte Oligonukleotidsonden äquivalenter Länge (Abbildung 4.39).<sup>[176]</sup> Dies äußerte sich in der Differenz der  $T_M$ -Werte von *match* und *mismatch* Sonden-Target-Komplexen. So wies der Komplex aus dem MB **84** und einem perfekt komplementären Target (**86**) eine um  $\Delta T_M = 14\ \text{K}$  höhere Stabilität auf als der Komplex mit der einzelbasenfehlpaarenden Zielsequenz (**87**). Die unstrukturierte Sonde **85** diskriminierte das *mismatch* Target mit einem niedrigeren  $\Delta T_M = 8\ \text{K}$ . Die zugrundeliegende Ursache ist laut ihrer Annahme das Gleichgewicht zwischen Haarnadelstruktur und



**Abbildung 4.39:** Hybridisierungsexperimente von Bonnet *et al.* mit dem MB **84** und dem unstrukturierten Oligonukleotid **85**.<sup>[176]</sup> F = Fluorophor, Q = Quencher.

unstrukturierter Form, das bei den haarnadelförmigen Sonden mit der Bildung des Sonden-Target-Komplexes konkurriert. Die Öffnung der doppelhelikalen Struktur ist mit einer energetischen Barriere verbunden, die jedoch durch die Bildung des Target-Komplexes kompensiert werden kann.

Ein analoger Zusammenhang sollte auch für die peptidbasierten Haarnadelstrukturen gelten. Erste Verdrängungsexperimente von Dr. Thurley, bei denen verschieden strukturierte PNA-Peptid-Konjugate auf ihre Affinitäten zu den nah verwandten SH2-Domänen der Src- und Lck-Kinase untersucht wurden, zeigten, dass mit einer erhöhten Stabilität der Sondenstruktur eine erhöhte Diskriminierung zwischen den SH2-Domänen einhergeht (Tabelle 4.12).<sup>[183]</sup> So wies die strukturierte Sonde **88** mit

**Tabelle 4.12:** Relative Bindungsaffinitäten der PNA-Peptid-Konjugate für die Src und Lck SH2-Domäne.<sup>[183]</sup>

Sequenz (H-K- <i>PNA I</i> -EPQpYEEIP- <i>PNA II</i> -K-G-NH <sub>2</sub> )			IC <sub>50</sub> [μM]		IC <sub>50,Src</sub> :	
<i>PNA I</i>	<i>PNA II</i>	T <sub>M</sub> [°C]	Src SH2	Lck SH2	IC <sub>50,Lck</sub>	
<b>88</b>	ttgg	ccaa	57	2.2 (± 0.2)	8.5 (± 0.9)	1 : 3.9
<b>89</b>	tttg	caaa	29	1.9 (± 0.1)	5.4 (± 0.5)	1 : 2.8
<b>90</b>	gcta	ccaa	n.b.	1.2 (± 0.1)	1.3 (± 0.1)	1 : 1.1

IC<sub>50</sub>-Werte wurden durch Titration zu einem Proteinkomplex mit dem Referenzpeptid FAM-GpYEEIA-NH<sub>2</sub> und Messung der Fluoreszenzanisotropie in einer Dreifachbestimmung ermittelt.

einem  $T_M$ -Wert von 57°C gegenüber der unstrukturierten Sonde **90**, bei der keine Schmelztemperatur bestimmt werden konnte, eine fast 4-fach größere Affinität zur Src als zur Lck SH2-Domäne auf.

Das thermodynamische Verhalten der PNA-Peptid-Konjugate bei der Bindung an die SH2-Domänen sollte mithilfe der Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC)



näher untersucht werden sowie die Selektivität im Vergleich zu einem Peptid anhand der experimentell erhaltenen thermodynamischen Daten geprüft werden.

Die ITC-Messungen in dieser Arbeit sollten sich an den in der Literatur beschriebenen Experimenten mit dem Peptid Ac-PQpYEEIPI-NH<sub>2</sub> und der Src SH2-Domäne orientieren, bei denen die Proteindomäne in der Zelle vorgelegt und das Peptid zutitriert wurde.<sup>[42,44,191]</sup> Um die notwendigen Konzentrationen an Proteindomäne und Konjugat abzuschätzen, wurde der sogenannte C-Wert herangezogen, der die Qualität einer Messung beschreibt (Gleichung 4.1).<sup>[192]</sup>

$$C = \frac{N \cdot c_{\text{Probenzelle}}}{K_D} \quad (4.1)$$

Bei C-Werten zwischen 10 und 500 erhält man eine gut auswertbare, sigmoidale Bindungsisotherme, die eine hohe Genauigkeit des errechneten  $K_D$ -Wertes gewährleistet. Es wurden  $K_D$ -Werte um 1  $\mu\text{M}$  und eine Bindungsstöchiometrie  $N$  von 1 für die PNA-Peptid-Konjugate erwartet. Daraus ergibt sich aus Gleichung 4.1 direkt der notwendige Konzentrationsbereich von 10 bis 500  $\mu\text{M}$  für die Proteindomäne in der Probenzelle. Die Konzentration des Titranden sollte 10-fach höher liegen, um eine detektierbare Wärmetönung zu garantieren, was einem Konzentrationsbereich von 0.1 bis 5 mM entspricht.

Es wurden zwei Bindungssequenzen für die SH2-Domänen auf ihre thermodynamischen Parameter untersucht, die in Verdrängungsexperimenten mit Peptiden bereits eine Selektivität für eine Domäne aufwiesen (Tabelle 4.13).<sup>[184]</sup> Das pYEEI-Peptid, ein Segment aus dem *hamster polyomavirus middle-sized tumor* (hmT)-Antigen zeigte eine etwas höhere Affinität zu der Src- als zu der Lck SH2-Domäne. Das C-terminale Segment der Lck-Kinase mit dem pYQPQP-Motiv präferierte hingegen die Bindung an die eigene SH2-Domäne. Die abgeleiteten PNA-Peptid-Konjugate und die entsprechenden Peptidsonden wurden hergestellt (Kapitel 4.1.1) und bezüglich ihrer Haarnadelstabilität charakterisiert (Kapitel 4.2.1).

Um die optimalen Messbedingungen mit wenig Materialverbrauch und geringer Dauer der Einzelmessungen zu identifizieren, erfolgte zunächst eine Variation der Versuchsparameter, wie der Nutzung diverser Kalorimeter (VP ITC, ITC 200) und der Änderung der experimentellen Konfiguration (Kapitel 6.7). Das VP ITC-Gerät von Prof. Ernsting (HU Berlin) zeichnete sich durch geringe Fluktuationen der Basislinie und einer hohen Empfindlichkeit gegenüber Wärmetönungen aus und wurde für folgende Experimente verwendet. Um die Scherkräfte auf das Protein zu minimieren, wurde das Protein in den Bindungsexperimenten zu einer PNA-Peptid-

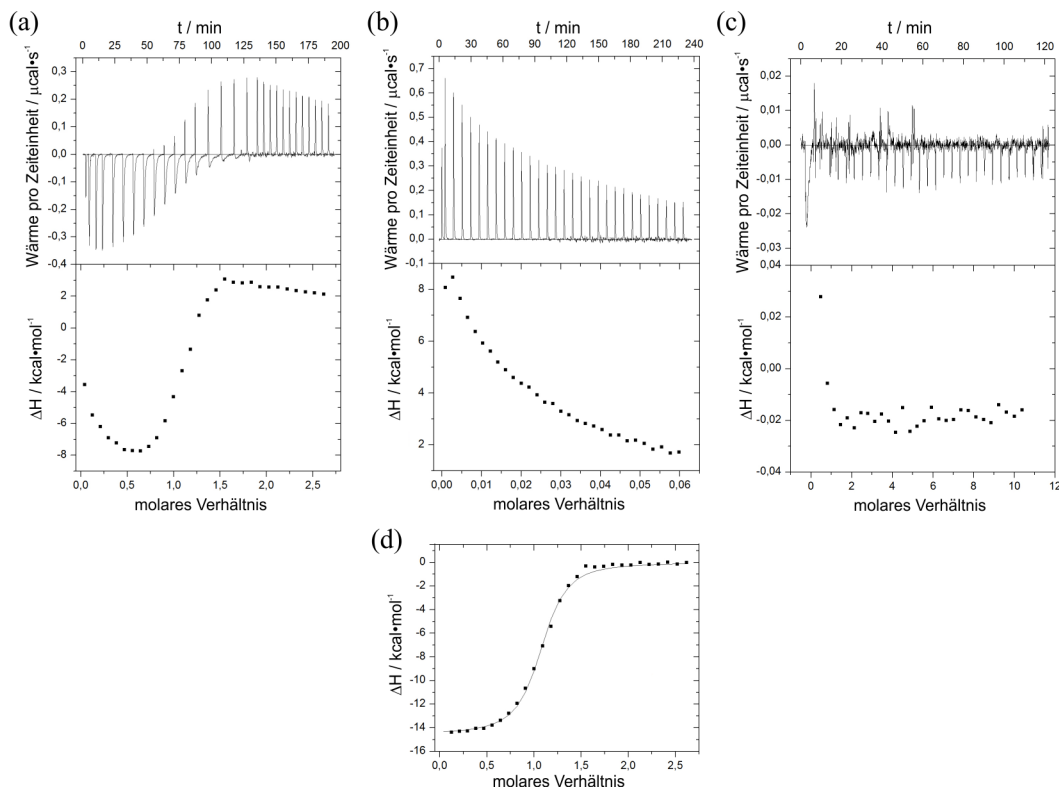
**Tabelle 4.13:** Relative Bindungsaffinitäten der Phosphopeptide für die Src und Lck SH2-Domäne.<sup>[184]</sup>

*	Peptidsequenz	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	
		GST-Src SH2	GST-Lck SH2
hmT pY324	EPQpYEEIPIYL	1.5	1.8
Lck pY505	TEGQpYQPQP	58	8.2

\* Ursprungprotein mit Position des pY-Restes in der Proteinsequenz. IC<sub>50</sub>-Werte wurden durch einen Verdrängungsassay mit einem <sup>125</sup>I-markierten Peptid bestimmt.

Konjugatverdünnung titriert. Für die Charakterisierung des eigentlichen Bindungsprozess mussten die Verdünnungsenthalpien der Komponenten in separaten Titrationen bestimmt und miteinbezogen werden. In Abbildung 4.40 a ist am Beispiel der Titration von GST-Src SH2 zu dem Konjugat **16** ein typisches Injektionsprofil dargestellt. Aus der Integration der Signale und deren Auftragung gegen das molare Verhältnis erhielt man eine Bindungsisotherme, die anfangs exotherme Werte aufwies und im Fortgang der Titration in den endothermen Bereich überging. Nach Subtraktion der Verdünnungsenthalpien der Bindungspartner, die durch die Titration des Proteins in Puffer (Abbildung 4.40 b) und des Puffers in die Konjugatverdünnung (Abbildung 4.40 c) bestimmt wurden, wurde eine sigmoidale Bindungsisotherme im exothermen Bereich erhalten (Abbildung 4.40 d). Der Fit nach dem Modell für eine Bindungsstelle führte zu den thermodynamischen Parametern. Die ITC-Experimente wurden so durchgeführt, dass eine exakte Bestimmung der  $\Delta H$ -Werte möglich war. Für eine höhere Genauigkeit der Entropie-Werte sowie der Bindungsdissoziationskonstanten mussten die Konzentrationen der Bindungspartner so variiert werden, dass eine flachere Bindungsisotherme erhalten wird.

Es wurde bei den Testmessungen mit der Src SH2-Domäne in HEPES-Puffer deutlich, dass ab einem molaren Verhältnis von 1 die Schwankung der Basislinie erheblich zunahm, was eine Auswertung der Rohdaten erschwerte und auf die Instabilität der Src SH2-Domäne im HEPES-Puffer zurückzuführen war. Bei der Literaturrecherche nach einer alternativen Pufferzusammensetzung wurde ein MOPS-Puffer für die nachfolgenden ITC-Messungen mit der nah verwandten Lck SH2-Domäne für am geeignetsten identifiziert.



**Abbildung 4.40:** ITC-Experiment mit optimierten Bedingungen. Injektionsprofil und Integrationswerte der Titration von (a) GST-Src SH2 (262  $\mu\text{M}$ ) in **16** (22  $\mu\text{M}$ ), (b) GST-Src SH2 (262  $\mu\text{M}$ ) in HEPES-Puffer und (c) HEPES-Puffer in **16** (22  $\mu\text{M}$ ). (d) Korrigierte Bindungsisotherme. Bedingungen: 25  $^{\circ}\text{C}$ , 30 x 10  $\mu\text{l}$  Injektionen, 300 rpm, *spacing time*: 3-10 min.

### 4.5.1 ITC-Messungen mit GST-Lck SH2

Die Ergebnisse der Messreihe mit dem Fusionsprotein der Lck SH2-Domäne sind in Tabelle 4.14 zusammengefasst. Alle Messungen wurden einmalig durchgeführt, um zunächst einen Gesamtüberblick zu erhalten. Sämtliche untersuchten Sonden haben mit einer Stöchiometrie von  $N \approx 1$  in einem exergonen Prozess an die Proteindomäne gebunden. Das Experiment mit dem Konjugat **18** wurde aufgrund der extrem abweichenden  $\Delta H$ - und  $T\Delta S$ -Werte wiederholt. Die Fehler wurden für eine Einschätzung der Unterschiede auf die restlichen Messungen übertragen ( $K_D$ : 26 %,  $\Delta H$ : 7 %,  $T\Delta S$ : 27 %,  $\Delta G$ : 1 %).

Die unstrukturierten PNA-Peptid-Konjugate **21** und **26-31** wiesen analoge Affinitäten zur Lck SH2-Domäne wie die Peptidsonde **32** auf. Mit zunehmender Stabilität der PNA-Stammregion des Konjugats geht eine Verschlechterung der Bindungsaffinität einher. Dies war zu erwarten, da infolge der Assoziation an die Bindungstasche des Proteins eine Öffnung der Haarnadelstruktur erfolgen muss, was mit einer

**Tabelle 4.14:** Thermodynamische Parameter der Messungen von GST-Lck SH2.

Sequenz (H-DD-K- <i>PNA I</i> -Peptid- <i>PNA II</i> -K-G-NH <sub>2</sub> )						
	<i>PNA I</i>	<i>PNA II</i>	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	$\Delta H$ [kcal·mol <sup>-1</sup> ]	$T\Delta S$ [kcal·mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta G$ [kcal·mol <sup>-1</sup> ]
Peptid = PQpYEEIPI						
<b>16</b>	gttg	caac	0.40	-15.1	-6.3	-8.7
<b>18</b>	tttg	caaa	0.19 ( $\pm 0.05$ )	-6.7 ( $\pm 0.5$ )	2.6 ( $\pm 0.7$ )	-9.2 ( $\pm 0.1$ )
<b>21</b>	gtca	ccaa	0.07	-14.9	-5.1	-9.8
<b>26</b>	gttg		0.06	-12.7	-2.9	-9.8
<b>27</b>	tttg		0.07	-13.2	-3.5	-9.8
<b>28</b>	gtca		0.04	-14.6	-4.5	-10.1
<b>29</b>		caac	0.05	-12.3	-2.4	-10.0
<b>30</b>		caaa	0.06	-12.6	-2.7	-9.8
<b>31</b>		ccaa	0.07	-13.1	-3.4	-9.7
Ac-PQpYEEIPI-NH <sub>2</sub>						
<b>32</b>			0.09	-12.8	-3.2	-9.6
Peptid = TEGQpYQPQP						
<b>23</b>	gttg	caac	4.69	-7.7	-0.5	-7.3
<b>24</b>	tttg	caaa	3.36	-6.9	0.6	-7.5
<b>25</b>	gtca	ccaa	2.36	-11.4	-3.7	-7.7
Ac-TEGQpYQPQP-NH <sub>2</sub>						
<b>33</b>			3.00	-9.0	-1.4	-7.5

Messungen bei 25 °C,  $c_{GST-Lck\ SH2} = 300\ \mu\text{M}$  (Spritze),  $c_{Konjugat} = 30\ \mu\text{M}$  (Zelle), MOPS-Puffer, 30 x 10  $\mu\text{l}$  Injektionen, 300 rpm.

energetischen Barriere verbunden ist. Um so überraschender war, dass die Enthalpieänderungen der Haarnadelstruktur **16** und der unstrukturierten Form **21** in einem ähnlichen Bereich lagen. Die Dehybridisierung der Stammregion sollte theoretisch mit einem deutlichen Enthalpieverlust (2-3 kcal·mol<sup>-1</sup> pro Wasserstoffbrücke<sup>[193]</sup>) verbunden sein. Die etwas kleineren  $\Delta H$ -Werte der PNA-Peptid-Konjugate **16** und **21**, im Vergleich zu der Peptidsonde **32**, deuten auf eine zusätzliche Wechselwirkung mit der Proteindomäne hin, wie sie bereits für die Src SH2-Domäne beobachtet wurde.<sup>[173]</sup> Um herauszufinden, welchen Einfluss die einzelnen PNA-Segmente besitzen, wurden die verschiedenen Konjugate mit der jeweils *N*- oder *C*-terminalen PNA-Sequenz synthetisiert und gemessen (**26-31**, Tabelle 4.14). Es zeigte sich, dass, mit Ausnahme von Konjugat **28**, kein signifikanter Unterschied zum Peptid **32** vorhanden war und somit kein messbarer Einfluss durch die Modifizierung mit dem Nukleinsäureanaloga PNA auf das Bindungsverhalten zum Protein bestand. Die Ursache der stark abweichenden Werte der Sonde **18** konnte bisher nicht geklärt werden.

Die Ergebnisse der Konjugate **23-25** und des Peptids **33** mit dem zweiten Bindungsmotiv sind in der Tabelle 4.14 ausschließlich zur Vervollständigung der Messresultate aufgeführt und werden aufgrund des flachen Kurvenverlaufs der Bindungsisotherme nicht in die thermodynamische Betrachtung der Bindung von PNA-Peptid-Konjugaten an die Proteindomäne miteinbezogen. Die Bestimmung der  $\Delta H$ -Werte war dadurch stark fehlerbehaftet. Die Untersuchung dieser Konjugate wurde nicht weiter verfolgt.

Unter Betrachtung der negativen Entropieänderungen sämtlicher Sonden, mit Ausnahme der PNA-Peptid-Konjugate **18** und **24**, lässt sich laut Gleichung 4.2 sagen, dass das Gesamtsystem mit der Assoziation der Sonde an die Proteindomäne an Ordnung zunimmt. Die positiven Entropieänderungen nehmen eine Sonderstellung ein, deren Ursache bisher ungeklärt blieb.

$$\Delta S = \sum S_{\text{gebunden}} - \sum S_{\text{ungebunden}} \quad (4.2)$$

Die Interpretation der thermodynamischen Daten ohne detaillierte strukturelle Informationen und molekulardynamische Berechnungen ist äußerst kompliziert und kann nur auf Vermutungen beruhen.

#### 4.5.2 ITC-Messungen mit GST-Src SH2

Es wurde die Bindung der PNA-Peptid-Konjugate **16**, **18**, **21** und des Peptids **32** zu der Src SH2-Domäne im Phosphat- bzw. HEPES-Puffer bei 25 °C untersucht (Tabelle 4.15). Alle betrachteten Sonden haben an die Src SH2-Domäne mit einer Stöchiometrie von  $N \approx 1$  in einem exergonen Prozess gebunden. Die Messungen mit dem strukturierten Konjugat **16** in HEPES- und Phosphat-Puffer zeigen deutlich wie entscheidend die Pufferwahl für die Affinität einer Sonde zum Targetprotein ist (vgl. Abbildung 4.15 in Kapitel 4.3). Die Sonde **16** wurde im Phosphat-Puffer 80 % schlechter gebunden als im HEPES-Puffer. Die  $K_D$ -Werte der PNA-Peptid-Konjugate in Phosphat-Puffer wurden mit zunehmender Haarnadelstabilität höher, unterscheiden sich jedoch nicht in dem Maße wie die Affinitäten zu der Lck SH2-Domäne. Die Ursache kann in der grundsätzlich geringeren Affinität liegen. Die  $\Delta H$ - und  $T\Delta S$ -Werte der PNA-Peptid-Konjugate waren deutlich kleiner als die der Peptidsonde, was auf eine zusätzliche Wechselwirkung der PNA-Segmente mit dem Protein hindeutet. Diese scheint sequenzabhängig zu sein und bedarf weiterer Untersuchungen. Außerdem blieb bisher die Ursache für die deutlich niedrigeren  $\Delta H$ - und  $T\Delta S$ -Werte des stabilen PNA-Peptid-Konjugats **16** ungeklärt.

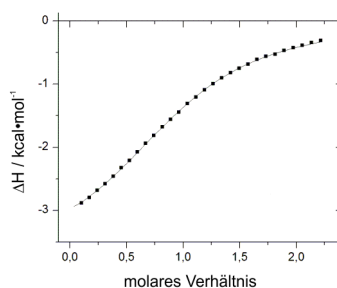
**Tabelle 4.15:** Thermodynamische Parameter der Messungen von GST-Src SH2.

Sequenz (H-DD-K- <i>PNA I</i> -PQpYEEIPI- <i>PNA II</i> -K-G-NH <sub>2</sub> )						
	<i>PNA I</i>	<i>PNA II</i>	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	$\Delta H$ [kcal·mol <sup>-1</sup> ]	$T\Delta S$ [kcal·mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta G$ [kcal·mol <sup>-1</sup> ]
<b>16</b>	gttg	caac	1.97	-13.5	-5.7	-7.8
<b>◆</b>	gttg	caac	0.38	-14.6	-5.8	-8.8
<b>18</b>	tttg	caaa	1.95	-9.8	-2.0	-7.8
<b>21</b>	gtca	ccaa	1.46	-10.3	-2.4	-8.0
<b>32</b>	Ac-PQpYEEIPI-NH <sub>2</sub>					
			1.35	-8.8	-0.8	-8.0
◇ <sup>[194]</sup>			0.18	-7.7	1.5	-9.2

Messungen bei 25 °C,  $c_{GST-SrcSH2} = 300 \mu\text{M}$  (Spritze),  $c_{Konjugat} = 30 \mu\text{M}$  (Zelle), Phosphat-Puffer, 30 x 10  $\mu\text{l}$  Injektionen, 300 rpm. ◆  $c_{GST-SrcSH2} = 262 \mu\text{M}$  (Spritze),  $c_{Konjugat} = 22 \mu\text{M}$  (Zelle), HEPES-Puffer (Abbildung 4.40). ◇<sup>[194]</sup>  $c_{SrcSH2} = 30 \mu\text{M}$  (Zelle),  $c_{Konjugat} = 400 \mu\text{M}$  (Spritze), HEPES-Puffer.

Ein Vergleich der thermodynamischen Parameter des Peptids **32** mit den Literaturwerten zeigt, dass, neben der aufgrund verschiedener Pufferzusammensetzungen veränderten Affinität, die Variation der experimentellen Konfiguration einen maßgeblichen Einfluss auf die Entropieänderung des Systems hat (Tabelle 4.15). So weist die Titration des Peptids in eine verdünnte Lösung der Proteindomäne einen positiven  $T\Delta S$ -Wert auf. Im Gegensatz dazu stehen die in dieser Arbeit ermittelten negativen  $T\Delta S$ -Werte bei der Titration des Proteins in eine Konjugatverdünnung.

Die ITC-Messungen mit dem zweiten Bindungsmotiv TEGQpYQPQP führten zu sehr flachen Bindungsisothermen, die eine Bestimmung der  $\Delta H$ -Werte unmöglich machte (Abbildung 4.41). Trotz Veränderung der experimentellen Konfiguration und Verwendung der maximal möglichen Komponentenkonzentrationen konnte bereits bei der Titration mit dem Peptid **33** die Form einer sigmoidalen Bindungsisother-



**Abbildung 4.41:** Korrigierte Bindungsisotherme der Titration von Peptid **33** (5 mM) in GST-Src SH2 (515  $\mu\text{M}$ ). Bedingungen: 25 °C, 30 x 10  $\mu\text{l}$  Injektionen, 300 rpm, *spacing time*: 10 min, Phosphat-Puffer.

me sowie der Wendepunkt nur erahnt werden, was sich in einem schlechten C-Wert von 0.2 und einem  $K_D$ -Wert im dreistelligen  $\mu\text{M}$ -Bereich widerspiegelte. Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse wurde eine Verschlechterung der Bindungsaffinität beim Übergang zu den strukturierten Sonden erwartet, auf deren explizite Messung allerdings verzichtet und dieses Bindungsmotiv nicht weiter bearbeitet wurde.

### 4.5.3 ITC-Messungen bei verschiedenen Temperaturen

Mithilfe der ITC-Messungen sollte die Hypothese bestätigt werden, dass die Strukturierung auch bei peptidbasierten Sonden, in Analogie zu den DNA-basierten, eine höhere Diskriminierung ähnlicher Zielmoleküle im Vergleich zu unstrukturierten Sonden nach sich zieht. Als Parameter für die Einschätzung der Spezifität wurde die Differenz zwischen den freien Bindungsenthalpieänderungen der Src- und Lck SH2-Domäne gewählt. Je größer dieser  $\Delta\Delta G$ -Wert, desto spezifischer bindet die jeweilige Sonde die SH2-Domäne der Lck-Kinase (Tabelle 4.16). Im Gegensatz zu den Lite-

**Tabelle 4.16:** Übersicht der freien Bindungsenthalpieänderungen.

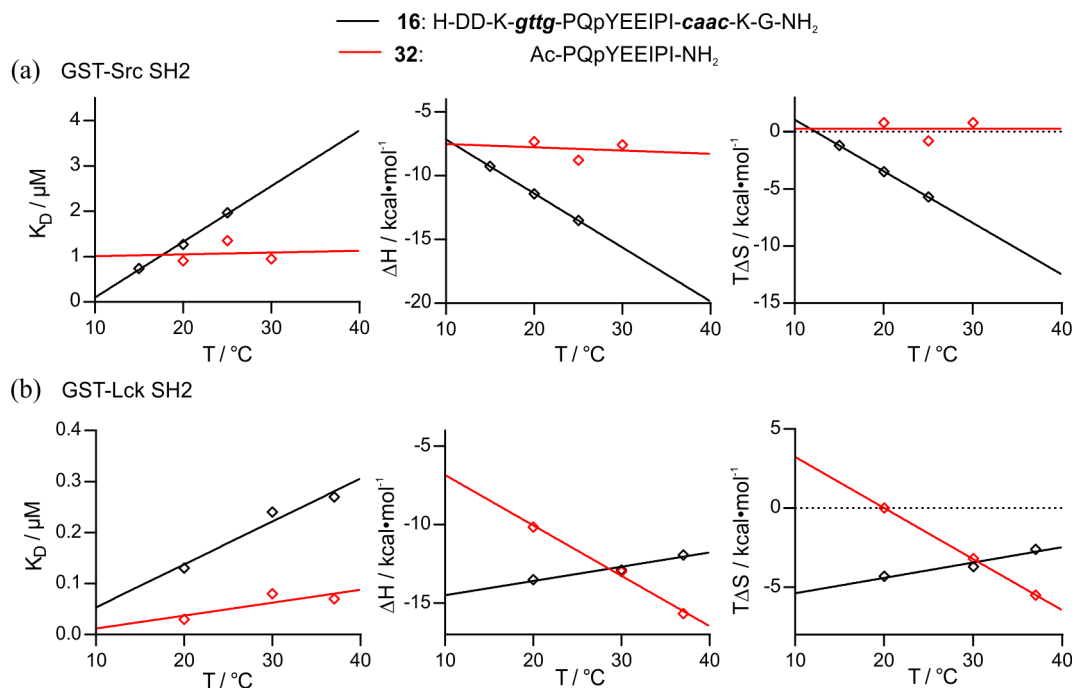
Sequenz			$\Delta G$		$\Delta\Delta G$
(H-X-K-PNA I-PQpYEEIPI-PNA II-K-G-NH <sub>2</sub> )			[kcal·mol <sup>-1</sup> ]		
X	PNA I	PNA II	Lck SH2	Src SH2	[kcal·mol <sup>-1</sup> ]
<b>16</b>	gttg	caac	-8.7	-7.8	0.9
<b>18</b> DD	tgtg	caaa	-9.3	-7.8	1.5
<b>21</b>	gtca	ccaa	-9.8	-8.0	1.8
<b>32</b>	Ac-PQpYEEIPI-NH <sub>2</sub>		-9.6	-8.0	1.6

bei 25 °C,  $\Delta\Delta G = \Delta G_{GST-Src SH2} - \Delta G_{GST-Lck SH2}$ .

raturdaten (vglw. Tabelle 4.13) lag generell eine höhere Affinität für die Lck SH2-Domäne vor, was auf die schlechten Bindungseigenschaften der Src SH2-Domäne in Phosphat-Puffer zurückzuführen ist. Die experimentellen Ergebnisse wurden trotzdem zur weiteren Charakterisierung der PNA-Peptid-Konjugate herangezogen. Die Messungen bei 25 °C zeigten, dass die unstrukturierte Sonde **21** sowie das Peptid **32**, entgegen der Erwartung, eine höhere Diskriminierung als das haarnadelförmige Konjugat **16** zwischen den nah verwandten SH2-Domänen aufwiesen.

Die Untersuchung der Sonde **16** und des Peptids **32** bei verschiedenen Temperaturen sollte aufdecken, ob sich die Spezifität umkehrt oder die Probe **16** in einem anderen Temperaturbereich eine höhere Selektivität aufweist. Die Experimente wurden unter analogen Bedingungen bei 20, 30 und 37 °C durchgeführt. Die Schmelzkurve der strukturierten Sonde **16** zeigt, dass sie auch bei 37 °C quantitativ als Haarnadel

vorliegt. Bei den ITC-Messungen mit der Src SH2-Domäne und dem strukturierten Konjugat **16** konnten für 30 und 37 °C keine auswertbaren Rohdaten erhalten werden. Um mehr Datenpunkte zu generieren, wurde somit eine Messung bei 15 °C durchgeführt. Die graphischen Darstellungen der Ergebnisse bezogen auf die Temperatur zeigten deutliche Unterschiede im Bindungsverhalten der SH2-Domänen (Abbildung 4.42). Allen gemein ist, dass die Bindungsaffinitäten mit sinkender Tempera-



**Abbildung 4.42:** Temperaturabhängige Auftragung der thermodynamischen Parameter von (a) GST-Src SH2 und (b) GST-Lck SH2. Der Fit entspricht einer linearen Regressionsgerade.

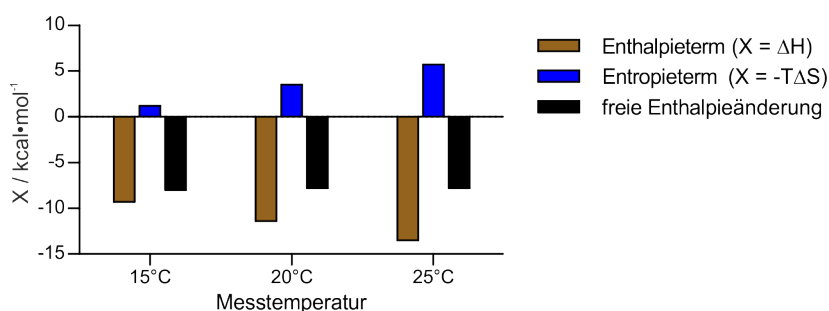
tur steigen, was bei der strukturierten Sonde **16** stärker ausgeprägt ist als bei dem Peptid **32**. Die Tendenzen bei den Enthalpie- und Entropieänderungen waren für die jeweilige Domäne identisch. Bei der Lck SH2-Domäne war für das Konjugat **16** eine Zunahme beider Parameter mit der Temperatur zu verzeichnen. Das Peptid **32** zeigte mit einer Abnahme bei steigender Temperatur einen gegenläufigen Trend. Im Kontrast dazu standen die Verläufe der linearen Regressionsgeraden bei der Bindung an die Src SH2-Domäne. Die  $\Delta H$ - und  $\Delta S$ -Werte der strukturierten Form **16** sanken mit erhöhter Temperatur, wohingegen die Bindung des Peptids **32** von der Temperaturveränderung nahezu unbeeinflusst blieb. Die Varianz im Verlauf der Graphen zeigt, dass sich das Bindungsverhalten der beiden Domänen deutlich voneinander unterscheidet. Besonders die mit ansteigender Temperatur, zunehmenden  $\Delta H$ - und  $\Delta S$ -Werte der Lck SH2-Domäne bei der strukturierten Probe **16** erfordern eine ge-



naue Untersuchung.

### Enthalpie-Entropie-Kompensation

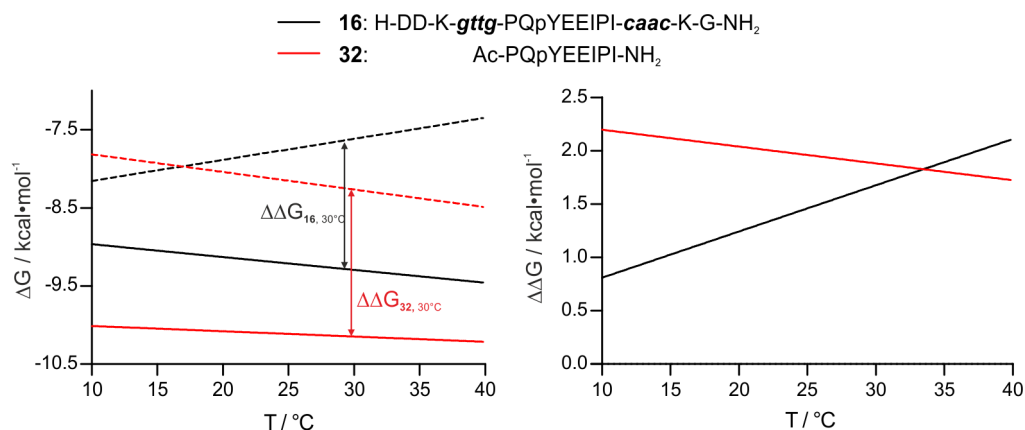
Die zugrundeliegende Ursache der analogen Tendenzen der  $\Delta H$ - und  $\Delta S$ -Werte der jeweiligen Messreihe bezeichnet man als Enthalpie-Entropie-Kompensation.<sup>[195,196]</sup> Die Verstärkung einer Bindung (kleinere  $\Delta H$ -Werte) geht mit der Erniedrigung der Unordnung im System (kleinere  $\Delta S$ -Werte) einher, was zu einer nur geringen Beeinflussung der freien Enthalpie des Systems führt. Aus der Abbildung 4.43 der thermodynamischen Parameter der Bindung von Sonde **16** an die Src SH2-Domäne geht hervor, dass mit einer Erhöhung des Enthalpieterms ( $\Delta H$ ) ein Anstieg des Entropieterms ( $-T\Delta S$ ) verbunden ist. Des Weiteren wird ersichtlich, dass  $\Delta G$  über den betrachteten Temperaturbereich maßgeblich von dem Enthalpieterm bestimmt wird, wodurch dennoch leichte Unterschiede in der Änderung der freien Enthalpie entstehen.



**Abbildung 4.43:** Vergleich des Enthalpie- ( $X = \Delta H$ ) und Entropieterms ( $X = -T \cdot \Delta S$ ) und ihr Beitrag zur freien Enthalpieänderung des Systems ( $\Delta G$ ) am Beispiel der Bindung von **16** an die GST-Src SH2-Domäne.

### Selektivität bzgl. der SH2-Domänen

Um Aussagen über die Diskriminierungseigenschaften der strukturierten (**16**) und unstrukturierten Sonde (**32**) gegenüber den SH2-Domänen zu treffen, wurden die jeweiligen  $\Delta G$ -Werte gegen die Temperatur aufgetragen und die Differenzen  $\Delta\Delta G$  von **16** und **32** bei verschiedenen Temperaturen betrachtet (Abbildung 4.44). Es ist auch hier zu beachten, dass, trotz der verwendeten Src SH2-spezifischen Erkennungssequenz, über den gesamten, untersuchten Temperaturbereich eine höhere Selektivität der Sonden für die Lck SH2-Domäne vorlag. Es wurde angenommen, dass die aufgeführten Tendenzen unter Vernachlässigung der Absolutwerte trotzdem Gültigkeit besitzen. Mit erhöhter Temperatur sank die Selektivität des Peptids **32** ge-



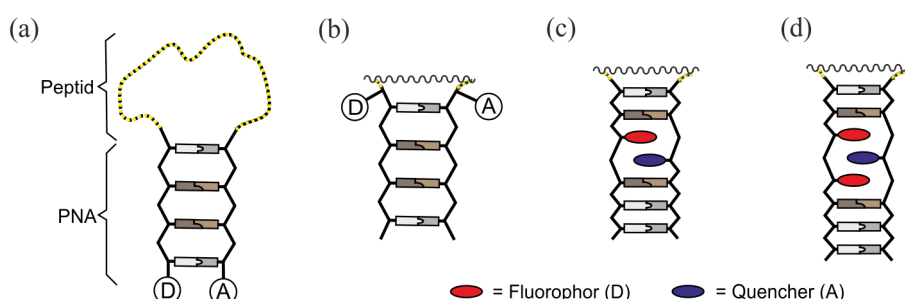
**Abbildung 4.44:** Graphische Darstellung der Temperaturabhängigkeit von  $\Delta G$  der Src SH2- (---) und Lck SH2-Domäne (—) und der Differenz  $\Delta\Delta G = \Delta G_{GST-Src\ SH2} - \Delta G_{GST-Lck\ SH2}$  der Sonden **16** und **32**.

genüber der Lck SH2-Domäne, wohingegen die der strukturierten Sonde **16** deutlich anstieg. Ab einer Temperatur von 33 °C wies das Konjugat **16** eine höhere Diskriminierungseigenschaft als das Peptid **32** auf. Dies unterstreicht einen Vorteil der strukturierten PNA-Peptid-Konjugate bei der Verwendung in der Proteindetektion. Die meisten biologischen Untersuchungen werden bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt, bei der die haarnadelstrukturierte Sonde laut diesen Ergebnissen eine größere Selektivität besitzt.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

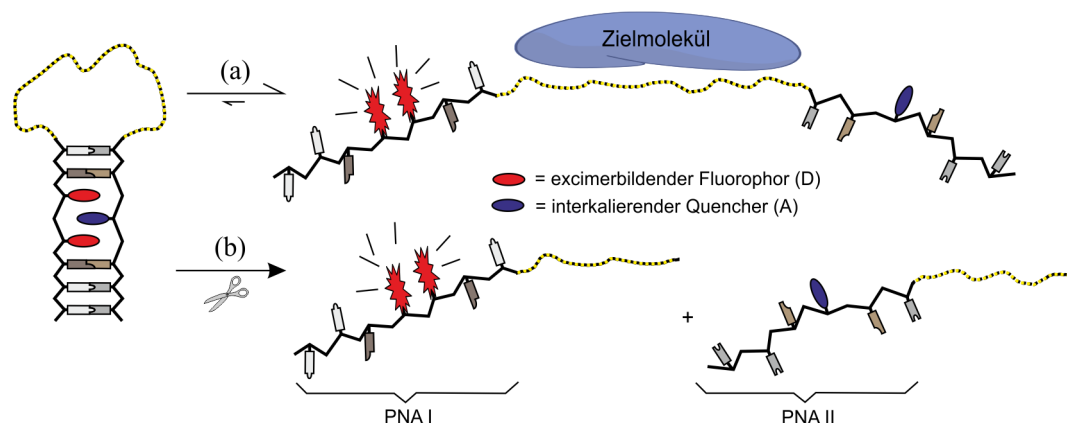
### 5.1 Zusammenfassung

Die Entwicklung von sensitiven Sonden für die direkte und selektive Detektion von Proteinen in biologischen Proben ist ein Schwerpunkt der Proteinwissenschaften. Vor allem die Anwendung der Quantifizierung von Proteinen in der medizinischen Diagnostik nimmt dabei einen hohen Stellenwert ein.<sup>[1–4]</sup> Haarnadelförmige, fluorogene PNA-Peptid-Konjugate, sogenannte *Hairpin Peptide Beacons* (HPBs), deren zentrales Peptidsegment als Erkennungssequenz für das Zielmolekül fungiert und von zwei zueinander komplementären PNA-Segmenten flankiert ist (Abbildung 5.1), bieten die Möglichkeit das Zielmolekül in einem homogenen Verfahren in Echtzeit nachzuweisen. Im ungebundenen Zustand findet aufgrund der erzwungenen Proximität von



**Abbildung 5.1:** Allgemeiner Aufbau der haarnadelförmigen, fluorogenen PNA-Peptid-Konjugate: (a) terminal markierter, (b) sequenzintern markierter HPB und (c) monomerbasierter, (d) excimerbasierter IS-HPB.

Donor und Akzeptor eine effiziente Energieübertragung statt, die das Hintergrundsignal der Fluoreszenzsonde in Abwesenheit des Zielmoleküls minimiert. Ein Anstieg der Donoremission wird durch die Öffnung der doppelhelikalen PNA-Stammregion infolge der Wechselwirkung mit dem Zielmolekül induziert (Abbildung 5.2). Der Donorfluorophor wird dabei vom Akzeptorchromophor separiert, wodurch eine effiziente Energieübertragung unterbrochen wird. Die bisher untersuchten terminal markierten PNA-Peptid-Konjugate (Abbildung 5.1 a) erreichten mit einer maximal 12-fachen Signalverstärkung bei der Detektion der Src SH2-Domäne in Puffer<sup>[23,183]</sup>



**Abbildung 5.2:** Anstieg der Donoremission infolge der Wechselwirkung mit dem Zielmolekül am Beispiel des excimerbasierten *IS-HPBs* (a) durch reversible Assoziation an und (b) irreversible Spaltung durch das Zielmolekül.

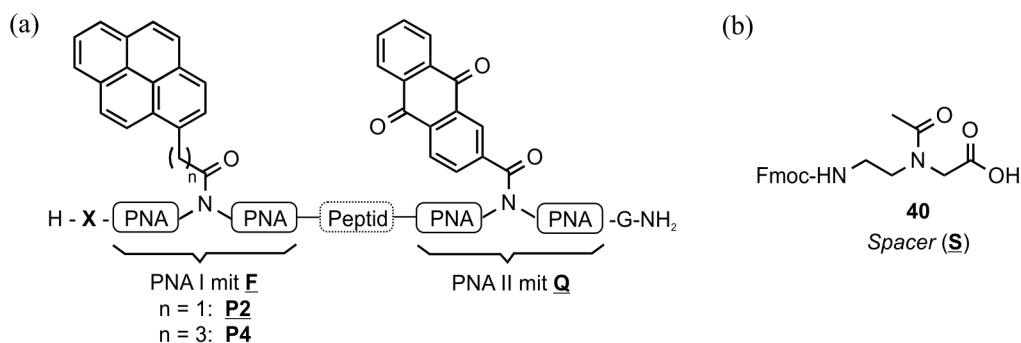
eine Responsivität, die weit unter der von strukturanalogen *Molecular Beacons* in der Untersuchung von Nukleinsäuren liegt.<sup>[24–26]</sup>

In dieser Arbeit gelang es, eine neue Sondenarchitektur der fluorogenen, haarnadelförmigen PNA-Peptid-Konjugate für eine sensitive Untersuchung von Proteinen und Proteaseaktivitäten zu entwickeln. Zur Steigerung der Responsivität wurden die Bewegungsfreiheitsgrade der Chromophore in einer veränderten Sondenstruktur eingeschränkt. Der vermutete, signalreduzierende Energietransfer im proteingebundenen Zustand sollte dadurch unterbunden werden. Die verwendeten Sondentypen unterschieden sich in der Art und Anbindung der signalgebenden Moleküle (Abbildung 5.1). Auf Basis des FAM-Dabcyl-Paares wurde, neben der terminal markierten Sonde (a,) ein sequenzintern markierter *HPB* (b) untersucht. Außerdem wurde mit den *In-Stem Hairpin Peptide Beacon (IS-HPB)* (c) ein alternatives SONDENSYSTEM entwickelt. Hierbei wurde der Fluorophor Pyren und der *Dark Quencher* Anthrachinon in die PNA-Stammregion integriert und fungierten als Pseudonukleobasen. Durch den Einbau einer zweiten benachbarten Pyreneinheit (d) war es möglich die Excimeremission des Pyrens für die Detektion zu nutzen. Diese zeichnet sich durch eine hohe Stokes-Verschiebung ( $\sim 140$  nm) und eine lange Fluoreszenzlebensdauer ( $\sim 40$ - $60$  ns) aus, die die Anwendung von zeitaufgelösten Fluoreszenzmethoden für die Detektion in autofluoreszenten, komplexen, biologischen Medien erlaubt.

Die Responsivität der PNA-Peptid-Konjugate wurde anhand zweier unterschiedlicher, proteinbasierter Modellsysteme untersucht. Zum einen wurden die SH2-Domänen der Src- und Lck-Kinase verwendet. Die Bindung an die Proteindomäne zwingt die Sonde in eine gestreckte Konformation und öffnet die Haarnadelstruktur.

tur (Abbildung 5.2 a). Dieser Bindungsvorgang verläuft reversibel und die Sonde bleibt dabei intakt. Zum anderen kam ein extrazellulärer Biomarker für die Progression von Tumoren, die Matrix-Metalloprotease 7 (MMP-7), zum Einsatz, um die Eigenschaften im Zuge einer destruktiven, irreversiblen, enzymatischen Spaltung zu analysieren (Abbildung 5.2 b).

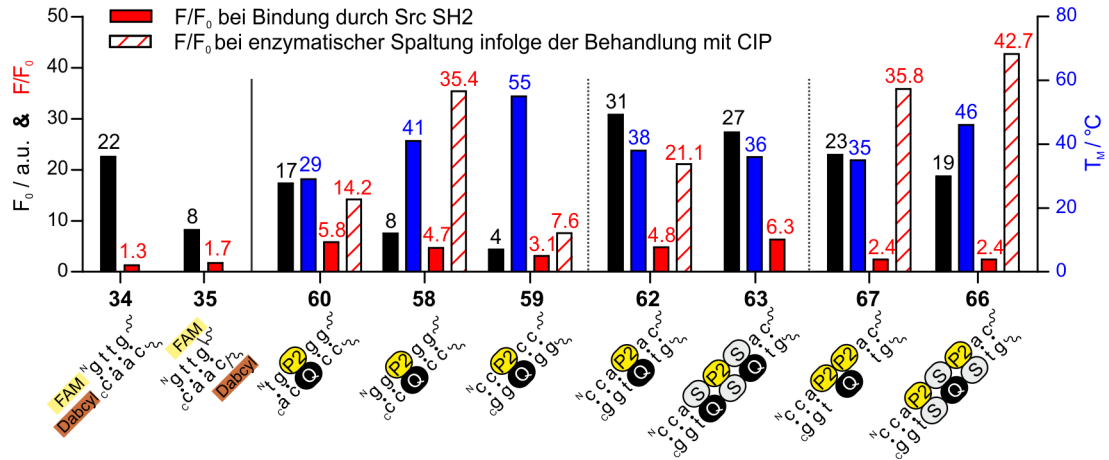
Sämtliche Sonden wurden an einem polymeren Träger unter Verwendung diverser Synthesestrategien, die sich in der Art der Schutzgruppenchemie unterschieden, hergestellt. Um einen Einblick in die fluoreszenzspektroskopischen Eigenschaften der neuartigen Markierungsmethode der *IS-HPBs* zu gewinnen, wurden zahlreiche Sequenzen synthetisiert, die in der Länge der PNA-Segmente I und II, in der Art der Chromophor flankierenden PNA-Basenpaarungen und in der Anbindung des Fluorophors variierten (Abbildung 5.3 a). Der abasische *Spacer* (**S**, **40**, Abbildung 5.3 b)



**Abbildung 5.3:** (a) Allgemeiner Aufbau der *IS-HPBs*. **X** = N-terminale Aspartatmodifikation,  $\underline{\text{F}}$  = Fluorophor,  $\underline{\text{Q}}$  = Quencher. (b) Struktur des Spacers (**40**).

wurde gegenüber den Chromophoreinheiten eingebaut, um durch die reißverschlussartige Anordnung eine extrahelikale Anordnung des Anthrachinons zu erschweren und die Bildung einer stabilen, doppelhelikalen Struktur zu begünstigen.

Die verschiedenen Sondentypen wurden mithilfe statischer Fluoreszenzmessungen bezüglich ihrer Hintergrundfluoreszenz  $F_0$  und der Responsivität  $F/F_0$  in Anwesenheit der SH2-Domänen charakterisiert. Die sequenzinterne Markierungsmethode führte zu einer erheblich reduzierten Hintergrundfluoreszenz im Vergleich zu der terminalen Markierung und der Peptidsonde. Trotzdem konnte nur eine minimale Verbesserung der Responsivität bei der Detektion von SH2-Domänen erreicht werden (Sonden **34**, **35** in Abbildung 5.4). Bei der Untersuchung der *IS-HPBs* mithilfe von thermischen Denaturierungsexperimenten wurde deutlich, dass eine stabilere Haarnadelstruktur, aufgrund der verstärkten Effizienz der Energieübertragung zwischen Fluorophor und Quencher, mit einer erniedrigten Hintergrundfluoreszenz in Abwesenheit des Zielproteins einherging (z. B. pentamere *IS-HPBs* **58-60** in Abbil-



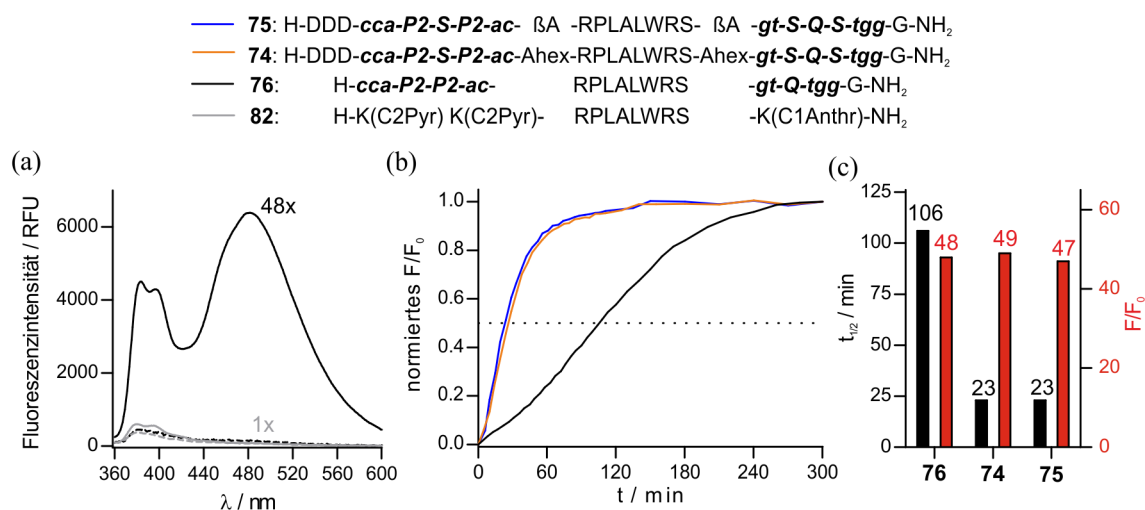
**Abbildung 5.4:** Eigenschaften einer Auswahl an SH2-spezifischen Sonden, u. a. Hintergrundfluoreszenz, Schmelztemperatur und Signalanstieg bei der Bindung durch Src SH2 und bei der enzymatischen Spaltung infolge der Behandlung mit CIP. Illustriert sind jeweils die Stammregionen. Peptid = PQpYEEIPI.

dung 5.4). Jedoch resultierte dies nicht in erhöhten Signalanstiegen bei der Bindung durch die SH2-Domänen. Im Gegenteil, eine zunehmende Stabilität korrelierte bei bauähnlichen Sonden mit einem Verlust an Responsivität. Wahrscheinlich konnte, trotz erheblicher Einschränkung der Flexibilität durch die sequenzinterne und stamminterne Markierung, eine Interaktion zwischen Fluorophor und Quencher im proteingebundenen Zustand nicht unterbrochen werden. Des Weiteren kann eine zusätzliche Löschung der Fluorophoremmission durch die Aminosäuren der Proteinoberfläche nicht ausgeschlossen werden.

In weiterführenden Experimenten mit den SH2-spezifischen *IS-HPBs* sollte der maximale Fluoreszenzanstieg infolge einer enzymatischen Spaltung ermittelt werden. Die Sonden wurden dafür zunächst mit der alkalischen Phosphatase (CIP, isoliert aus dem Kälberdarm) inkubiert, um eine Spaltstelle für die Protease Chymotrypsin zu generieren. Es zeigte sich nach der Auswertung der Fluoreszenzspektren, dass die Sonden bereits quantitativ gespalten wurden. Die Phosphatase enthielt Verunreinigungen, die anhand von Massenspektren der Spaltprodukte diversen Proteasen zugeordnet werden konnten. Die durch die enzymatische Spaltung erzielten Signalanstiege waren deutlich höher als bei der Bindung an die SH2-Domäne (Abbildung 5.4) und korrelierten mit der Höhe der intramolekularen Schmelztemperatur bei analoger Sequenzumgebung der Chromophore (Abbildung 5.4, z. B. **58+60** und **66+67**). Besonders die excimerbasierten *IS-HPBs* **66** und **67** zeigten ihr Potential als sensitive Reporter mit den höchsten Signalanstiegen bei quantitativer Spaltung. Eine

intermolekulare Duplexbildung der kurzen PNA-Segmente konnte durch thermische Denaturierungsexperimente mit den Spaltprodukten ausgeschlossen werden. Weiterhin hatten die Fluorophor-flankierenden PNA-Monomere einen erheblichen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität im geöffneten Zustand und damit auf den Signalanstieg. So wies bspw. Sonde **59**, trotz des höheren  $T_M$ -Wertes, eine verringerte Signalsteigerung im Spaltungsexperiment als die Sonde **58** auf, was auf Löscheffekte der benachbarten c-Monomere zurückzuführen ist.

Die Entwicklung von Sonden für die Untersuchung der extrazellulären Biomarkers MMP-7 erfolgte auf Basis der gesammelten Erkenntnisse der SH2-spezifischen *IS-HPBs*. Es wurden excimerbasierten Sonden generiert, die sich durch den Einbau von Aminosäurelinkern in der Flexibilität des Peptidsegments und in der Stabilität des intramolekularen Duplexes unterschieden. Diese wurden zunächst mit einem statischen Fluoreszenzassay im *Well Plate*-Format auf ihre Fluoreszenzresponsivität im wässrigen Puffer geprüft (Abbildung 5.5). Mit den *IS-HPBs* konnten bis zu 49-fache

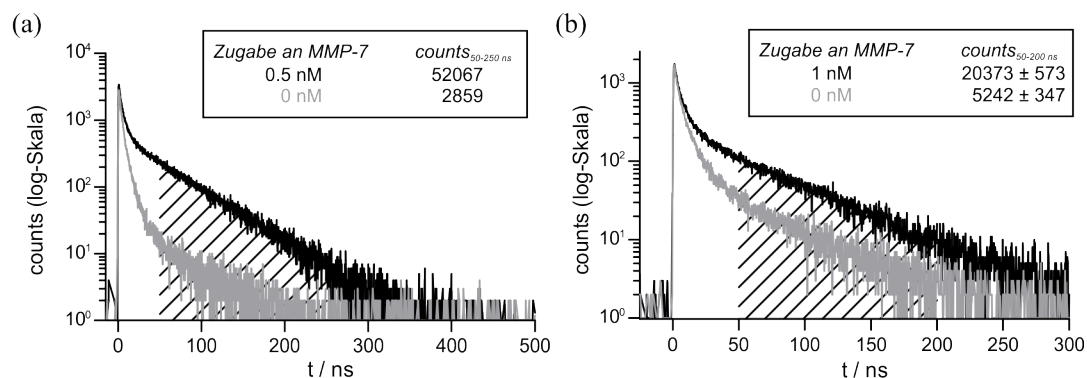


**Abbildung 5.5:** Auswahl an Ergebnissen der MMP-7-Detektion in Puffer. (a) Fluoreszenzspektren nach 24 h mit (—) & ohne (---) Zusatz von 25 nM MMP-7. (b) Zeitliche Veränderung des normierten Signalanstiegs bei 37 °C. (c) Ermittelte halbmaximale Spaltungszeiten & Signalanstiege der Fluoreszenzspektren bei 25 °C nach 24 h Inkubation mit 25 nM MMP-7.

Signalanstiege nach 24-stündiger Inkubation mit der Protease erzielt werden (Abbildung 5.5 a). Die Peptidsonde **82** zeigte im Vergleich eine geringfügige Signaländerung bei der Spaltung durch die Protease. Mit dem Einbau von Linkern, wie Aminohexansäure (*IS-HPB* **74**) oder β-Alanin (*IS-HPB* **75**), der *N*-terminalen Modifikation mit drei Aspartat-Einheiten und dem Einbau von *Spacer*-Einheiten konnte die Geschwindigkeit der enzymatischen Spaltung ohne einen Verlust an Responsivität um

das 5-fache im *Well Plate*-Assay gesteigert werden (Abbildung 5.5 b, c).

In weiterführenden Untersuchungen gelang unter Verwendung von zeitaufgelösten Messmethoden die Detektion des Biomarkers MMP-7 in autofluoreszenten, biologischen Medien (Abbildung 5.6).<sup>[197]</sup> Im Zellmedium DMEM\* konnte eine MMP-



**Abbildung 5.6:** TCSPC-Histogramme der MMP-7-Detektion in komplexen, biologischen Medien am Beispiel von Sonde **74**. Histogramme nach 24 h Inkubation mit (—) und ohne (---) MMP-7-Zusatz in (a) Zellmedium DMEM\* und (b) Humanserum. DMEM\* = DMEM komplettiert durch 10 % FCS & 1 % Antibiotika. Die Schraffur zeigt den integrierten Bereich an, dessen Zahlenwert oben angegeben ist.

7-Konzentration von 0.5 nM mit einem 20-fachen Signalanstieg nach 24 h detektiert werden (Abbildung 5.6 a). Nach 4 h sowie bei einer reduzierten MMP-7-Konzentration von 0.1 nM konnte ein qualitativer Nachweis mit einer 1  $\mu$ M Sondenkonzentration erbracht werden. Des Weiteren wurde nach Variation der Versuchsbedingungen eine MMP-7-Konzentration von 1 nM in Humanserum mit einem deutlichen, fast 4-fachen Signalunterschied zur Blindprobe detektiert (Abbildung 5.6 b). Dies entspricht einem kritischen Grenzwert in der Bewertung der Progression von Darmkrebs<sup>[54]</sup> und untermauert die Einsetzbarkeit der Sonde in der Diagnostik.

Es wurden erstmalig thermodynamische Parameter der Bindung von PNA-Peptid-Konjugaten an SH2-Domänen mithilfe der Isothermen Titrationskalorimetrie gemessen und in Relation zu dem sequenzgleichen Peptid gesetzt. Es deutete sich dabei das Vorhandensein einer zusätzlichen Wechselwirkung der PNA-Segmente mit der Proteindomäne an, die sich in kleineren Enthalpieänderungen im Vergleich zu den Peptidsonden zeigte. Die Selektivitätssteigerung infolge der Strukturierung der PNA-Peptid-Konjugate konnte anhand der thermodynamischen Untersuchungen bei 25 °C nicht belegt werden. Die ITC-Experimente bei verschiedenen Temperaturen offenbarten jedoch, dass ab einer Temperatur von 33 °C die strukturierte Sonde besser zwischen den nah verwandten SH2-Proteindomänen der Src- und Lck-Kinase



diskriminieren kann, was für eine Verwendung in zellbasierten Assays förderlich sein kann.

Zusammenfassend konnte die Responsivität bei der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung von Proteinen mit peptidbasierten Sonden durch die neue Architektur der *IS-HPBs* gesteigert werden. Die Verwendung der Excimeremission ermöglichte die direkte Detektion kleinster Konzentrationen im einstelligen nM-Bereich des Zielmoleküls in komplexen, biologischen Medien mit einer Sondenkonzentration von 1  $\mu$ M und bekräftigte eine Anwendbarkeit in der medizinischen Diagnostik. Weiterhin wurden erste Hinweise mithilfe thermodynamischer Untersuchungen erhalten, dass die Strukturierung einer peptidbasierten Sonde zu einer erhöhten Selektivität beiträgt.

## 5.2 Ausblick

Mit den fluorogenen *IS-HPBs* wurde ein neues Werkzeug für die Proteinuntersuchung entwickelt, das sich besonders für die sensitive Detektion von proteolytischen Zielmolekülen eignet. Unter Verwendung des Excimer-bildenden Fluorophors Pyren gelang in zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen der Nachweis kleinster Konzentrationen in komplexen, biologischen Medien (0.1 nM MMP-7 in Zellmedium, 1 nM MMP-7 in Humanserum). Bisherige Untersuchungen wurden in Fluoreszenzküvetten durchgeführt. In weiterführenden Experimenten könnte ein Assay entwickelt werden, der die simultane Untersuchung vieler Proben im *Well Plate*-Format gestattet. Des Weiteren sollte die Selektivität der MMP-7-spezifischen *IS-HPBs* mithilfe verwandter Matrix-Metalloproteasen getestet werden.

Der Nachweis anderer Proteasen ist ohne Weiteres durch den Austausch der zentralen Erkennungssequenz möglich und bedarf gegebenenfalls nur geringfügiger Veränderung der Sequenzen der PNA-Segmente, um eine stabile Haarnadelstruktur zu gewährleisten. Weiterhin wäre eine Erweiterung durch ein zweites Fluorophor-Quencher-System in der PNA-Stammregion denkbar, das durch mehrere Basenpaarungen vom ersten getrennt ist, um eine Wechselwirkung untereinander auszuschließen. Dadurch könnte die Sensitivität der Sonden infolge der gesteigerten Signalintensität bei der Prozessierung der Sonde deutlich erhöht werden. Dies erfordert allerdings eine Verlängerung der PNA-Stammregion, wodurch die Herstellung verschiedener Sequenzen mit unterschiedlichen Basenpaarungen und erneute Untersuchung der Haarnadelstabilität durch thermische Denaturierungsexperimente notwendig werden.

Der Einsatz von alternativen fluorogenen, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, die in der Lage sind als Pseudonukleobasen zu fungieren und an der Basenstapelung im Duplex teilzunehmen, wäre ebenfalls erstrebenswert. So zeichnet sich z. B. das Perylen durch eine Anregung im visuellen Bereich ( $\lambda_{ex} = 425 \text{ nm}$ ) aus, wodurch eine Detektion mit statischen Fluoreszenzmethoden in biologischen Medien ermöglicht wird. Zusätzlich erlaubt dieses Fluorophor eine Auslesung im visuellen Bereich bei einer Wellenlänge von 460 nm für die Monomeremission und 550 nm für die Excimeremission.

Eine tiefgründigere Untersuchung der zugrundeliegenden Triebkraft der Bindung von PNA-Peptid-Konjugaten an Proteine würde zu einem Verständnis der unterschiedlichen thermodynamischen Daten beitragen, die durch die Untersuchung von Konjugaten verschiedener Haarnadelstabilität in dieser Arbeit erhalten wurden. Es könnte bspw. ein zyklisches PNA-Peptid-Konjugat, welches an den Termini über eine Disulfidbrücke verknüpft ist, thermodynamisch untersucht werden. Durch die Behandlung mit reduzierenden Agenzien, wie TCEP, kann das Konjugat in eine offene Form überführt und direkt mit dem geschlossenen Konjugat verglichen werden.

## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Messgeräte und Hilfsmittel

#### Chemikalien

Die Fmoc-geschützten PNA-Monomere (Fmoc-t-Aeg-OH, Fmoc-c(Bhoc)-Aeg-OH, Fmoc-a(Bhoc)-Aeg-OH, Fmoc-g(Bhoc)-Aeg-OH) wurden von *Link Technologies* und die Boc-geschützten PNA-Monomere (Boc-t-Aeg-OH, Boc-c(Z)-Aeg-OH, Boc-a(Z)-Aeg-OH, Boc-g(Z)-Aeg-OH) von *ASM Research Chemicals* bezogen. Die Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden bei *NeoMPS*, *BioSolve*, *IRIS Biotech* (Fmoc-K(Mmt)-OH) und *Novabiochem* (Fmoc-K(Alloc)-OH) erworben. Die Aminosäurebausteine Fmoc-K(DabcyI)-OH<sup>[198]</sup> und Fmoc-Y(PO(NMe<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)-OH<sup>[199]</sup> wurden in der Arbeitsgruppe Seitz nach literaturbekannten Methoden hergestellt. Die polymeren Trägermaterialien für die Festphasensynthese wurden von *Novabiochem* (MBHA, 1.2 mmol·g<sup>-1</sup>) und *Rapp Polymers* (Tentagel R RAM, 0.19 mmol·g<sup>-1</sup>) bezogen. Die Kupplungsreagenzien PyBOP, HCTU, HBTU und HOBt wurden bei *Chemcube* und *Novabiochem* erworben. Für die PNA-Peptid-Konjugatsynthese wurden Lösungsmittel (DMF, NMP) mit einem geringen Wasseranteil (< 0.03 %) verwendet. Die Chromophore wurden von *Sigma Aldrich* (1-Pyrenessigsäure, Anthrachinon-2-carbonsäure) und *Alfa Aesar* (1-Pyrenbuttersäure) bezogen. Weitere Chemikalien stammten von *Acros Organics*, *Sigma Aldrich*, *Merck* und *ABCR*. Das Wasser wurde mit einer Reinstwasseranlage der Firma *membraPure* aufbereitet. Für die chromatographischen Methoden wurde MeCN mit HPLC-Reinheitsgrad ( $\geq 99.9\%$ ) der Firma *VWR* verwendet.

Die molekularbiologischen Materialien wurden vorwiegend von *Roth*, *Biochrom*, *AppliChem* und *VWR* bezogen. Das Humanserum (AB, männlich) wurde bei *Sigma Aldrich*, das Enzym MMP-7 bei *Calbiochem* und das Zellmedium DMEM, sowie die antibiotischen Zusätze Penicillin/Streptomycin bei *Life Technologies* erworben. Das Enzym CIP (120.4 U·mg<sup>-1</sup>) wurde von *AppliChem* bezogen.

### 6.1.1 Chromatographische Methoden

#### (Semi)präparative HPLC

Die synthetisierten Oligomere wurden mit einem Agilent 1100 Series-System gereinigt. Als Trennsäule wurde bei kleinen Syntheseansätzen (2-5  $\mu\text{mol}$ ) eine RP-C18A Polaris-Säule (5  $\mu\text{m}$  Partikel, 250 x 10 mm, 220 Å Porengröße) der Firma *Varian* mit einer Flussrate von 6  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  benutzt. Für große Ansätze (10-30  $\mu\text{mol}$ ) wurde als Trennsäule eine Nucleodur C18 Gravity-Säule (5  $\mu\text{m}$  Partikel, 250 x 21 mm, 110 Å Porengröße) der Firma *Machery-Nagel* mit einer Flussrate von 15  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  verwendet. Die Detektion und Fraktionssammlung erfolgte mithilfe eines Multiwellenlängendetektors bei  $\lambda = 210 \text{ nm}$  für die Peptide und bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  für die PNA-Peptid-Konjugate. Die linearen Laufmittelgradienten verliefen über einen Zeitraum von 30 Minuten.

Die Elution bei der (semi)präparativen und analytischen HPLC erfolgte mit folgenden Laufmittelzusammensetzungen und den jeweils aufgeführten Gradienten:

A 98.9%  $\text{H}_2\text{O}$ , 1% MeCN, 0.1% Säure (Agilent:  $\text{HCOOH}$ , Merck Hitachi: TFA)

B 98.9% MeCN, 1%  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1% Säure (Agilent:  $\text{HCOOH}$ , Merck Hitachi: TFA)

#### Analytische Chromatographie

Die Rohprodukte aus der Festphasensynthese, Testabspaltungen und synthetisierte Monomere wurden mit dem Agilent 1100 Series-System untersucht. Die Detektion erfolgte mit einem UV/Vis-Detektor ( $\lambda = 210$  bzw.  $260 \text{ nm}$ ) und einem VL-Quadrupol Massenspektrometer. Für die Monomere wurde eine RP-C18 Gravity-Säule (3  $\mu\text{m}$  Partikel, 12.5 x 2 mm, 130 Å Porengröße) der Firma *Machery-Nagel* mit einer Flussrate von 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  verwendet. Für die Oligomere wurde eine RP-C18A Polaris-Säule (3  $\mu\text{m}$  Partikel, 12.5 x 2 mm, 220 Å Porengröße) der Firma *Varian* mit einer Flussrate von 0.3  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  benutzt. Die Säulen wurden vor jedem Lauf auf  $55^\circ\text{C}$  temperiert. Die linearen Laufmittelgradienten verliefen über einen Zeitraum von 20 Minuten.

Die Analyse der gereinigten PNA-Peptid-Konjugate erfolgte zum einen mithilfe des Elite LaChrom-Systems der Firma *Merck-Hitachi* unter Verwendung eines Dioden-Array-Detektors. Es wurde eine auf  $55^\circ\text{C}$  temperierte RP-C18A Polaris-Säule (5  $\mu\text{m}$  Partikel, 250 x 4.6 mm, 220 Å Porengröße) der Firma *Varian* mit einer Flussrate von 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  benutzt. Die linearen Laufmittelgradienten verliefen über einen Zeitraum von 20 Minuten. Des Weiteren wurde ein Acquity<sup>TM</sup> UPLC-System von *Waters* mit einer auf  $50^\circ\text{C}$  temperierten BEH C18-Säule (1.7  $\mu\text{m}$  Parti-

kel, 50 x 2.1 mm, 130 Å Porengröße) von *Waters* bei einer Flussrate von 0.5 ml·min<sup>-1</sup> verwendet. Die linearen Laufmittelgradienten verliefen über einen Zeitraum von 4 Minuten.

### **Säulenchromatographie**

Die säulenchromatographische Reinigung der Monomere und deren Zwischenstufen wurde unter Verwendung von Kieselgel (0.035-0.070 mm, 60 Å) der Firma *Acros* durchgeführt. Die organischen Lösungsmittel für eine säulenchromatographische Reinigung wurden vor der Verwendung destilliert.

### **Dünnschichtchromatographie**

Es wurden Kieselgelplatten mit Fluoreszenz-Indikator (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) der Firma *Merck* verwendet. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht der Wellenlängen  $\lambda = 254$  nm und  $\lambda = 366$  nm, sowie durch folgende Anfärbereagenz: 300 mg Ninhydrin, 100 ml *n*-Butanol, 3 ml Essigsäure.

### ***Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)***

Die Isolierung der GST-Fusionsproteine aus dem Zelllysate erfolgte mit einem Äkta Chromatographie-System von *Amersham Biosciences*. Je nach Proteinmenge wurden mehrere 5 ml große GSTrap HP-Säulen von *GE Healthcare* mit je einer maximalen Bindungskapazität von 10 mg·ml<sup>-1</sup> in Reihe geschaltet. Das Chromatogramm wurde anhand der Absorption bei 280 nm aufgezeichnet. Gleichzeitig wurde neben dem Systemdruck die Leitfähigkeit des Durchflusses gemessen.

## **6.1.2 Spektroskopische Methoden**

### **Kernspinresonanz-Spektroskopie**

Sämtliche NMR-Spektren (<sup>1</sup>H, APT) wurden mit dem *Bruker*-DPX-500 NMR-Spektrometer aufgenommen. Als Referenzsignale dienten die entsprechenden Lösungsmittelsignale. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Mest-ReC. Die chemischen Verschiebungen  $\delta$  sind in ppm aufgeführt. Die Signalmultiplizitäten sind mit s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett und m = Multipllett angegeben. Die Kopplungskonstante *J* ist in Hertz (Hz) angegeben.

### **Massenspektrometrie**

Von den synthetisierten, modifizierten PNA-Monomeren Fmoc-Aeg(Boc)-OH (**38**), Fmoc-Aeg(Alloc)-OH (**39**) und Fmoc-Aeg(Ac)-OH (**40**) wurden hochaufgelöste Massenspektren mit einem Thermo-Electron-LTQ-FT-ICR-Massenspektrometer der Firma *ThermoElectron* gemessen. Die Ionisation wurde durch Elektrospray erzielt. Die

Signale wurden in Verhältnissen von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) angegeben.

Die Aufnahme der ESI-MS-Spektren erfolgte mit einem VL-Quadrupol Massenspektrometer infolge der chromatographischen Analyse. Die gefundenen Molmassen wurden aus den mehrfach geladenen Ionen unter Verwendung der "Deconvolution"-Funktion der Software *Agilent Chemstation* errechnet. Die theoretischen Werte wurden mithilfe des *Oligo Tools*<sup>[200]</sup> ermittelt.

Die MALDI-Massenspektren wurde mithilfe einer Voyager DE<sup>TM</sup> Pro Biospectrometry Workstation von *PerSeptive Biosystems* mit folgenden Parametern aufgenommen: Anregung mit Stickstoff-UV-Laser ( $\lambda = 337$  nm), Beschleunigungsspannung 25 000 V, Gitterspannung: 95 %, Guide Wire: 0.05 %, Delay Time: 500 ns, 50 Schüsse/Spektrum. Als Matrix wurde eine  $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  Lösung von Sinapinsäure in  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$  (1:1, v:v) verwendet. Die Auswertung der Massenspektren wurde mit dem Programm Data Explorer<sup>TM</sup> durchgeführt.

### UV/Vis-Spektroskopie

Die Beladung der Harze, sowie die Überprüfung der Kupplungseffizienz der manuellen Festphasensynthese wurde mit einem SmartSpec<sup>TM</sup> Plus Spektrophotometer der Firma *Bio-Rad* in 1 ml-Küvetten (114-QS, 10 x 4 mm von *Hellma*) unter Verwendung der Gleichung 6.1 ermittelt. Dafür wurde die Absorption des Dibenzofulven-Addukts ( $\epsilon_{300 \text{ nm}} = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) in 1 ml Fmoc-Abspaltlösung gemessen. Die Probenlösung wurde bei Bedarf mit einem Piperidin/DMF-Gemisch (4:1, v:v) verdünnt, so dass die Absorption im linearen Bereich von 0.1-1.0 lag.

$$A_{300 \text{ nm}} = c \cdot d \cdot \epsilon_{300 \text{ nm}} \quad (6.1)$$

Die Konzentrationsbestimmung der Peptid-PNA-Konjugat-Stammlösungen erfolgte über die Absorptionsmessung bei 260 nm mithilfe des Mikrovolumenphotometers ND-1000 der Firma *peqLab Biotechnologie GmbH*. Der entsprechende molare Extinktionskoeffizient wurde additiv aus den molaren Extinktionskoeffizienten der PNA-Monomere aus den Vorgaben der Firma Panagene<sup>[201]</sup> und aus den selbst ermittelten für Pyren und Anthrachinon berechnet. Dabei wurde die Absorption des Peptid-Fragments vernachlässigt. Die Chromophore FAM und Dabcyl wurden wie ein zusätzliches t-Monomer behandelt. Die Konzentration der unmarkierten Peptid-Stammlösungen wurde über die Absorptionsmessung bei 214 nm mithilfe eines Cary 100 Bio UV-Spektrometers der Firma *Varian* in 1 ml-Küvetten (114-QS, 10 x 4 mm von *Hellma*) bestimmt. Der jeweilige molare Extinktionskoeffizient wurde anhand von Literaturdaten errechnet.<sup>[202]</sup> Für die Konzentrationsbestimmung der markierten Peptid-Stammlösungen wurde der Mikrovolumenphotometer ND-1000 der Fir-

ma *peqLab Biotechnologie GmbH* und der Extinktionskoeffizient der Chromophore verwendet.

PNA-Monomere	a:	$\varepsilon_{260\text{ nm}} = 13700 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
	g:	$\varepsilon_{260\text{ nm}} = 11700 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
	c:	$\varepsilon_{260\text{ nm}} = 6600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
	t:	$\varepsilon_{260\text{ nm}} = 8800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
Chromophore	FAM:	$\varepsilon_{492\text{ nm}} = 78000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
	1-Pyrenessigsäure:	$\varepsilon_{260\text{ nm}} = 15080 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
	1-Pyrenbuttersäure:	$\varepsilon_{260\text{ nm}} = 12510 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
	Anthrachinon-2-carbonsäure:	$\varepsilon_{260\text{ nm}} = 29960 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Die thermischen Denaturierungsexperimente wurden in einem entgasten, Ar-gesättigten, wässrigen Puffersystem (140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) durchgeführt. Dabei wurden die Proben zunächst auf 90 °C mit einer Heizrate von 10 K·min<sup>-1</sup> erhitzt und wieder auf 20 °C abgekühlt. Anschließend wurde dreimal die Absorption bei 260 nm über einen Bereich von 20 bis 90 °C mit einer Heizrate von 0.5 K·min<sup>-1</sup> gemessen. Für die PNA-Peptid-Konjugate mit einer geringen Stabilität der Haarnadelstruktur wurde die Starttemperatur auf 12 °C reduziert. Die Bestimmung der Schmelztemperaturen  $T_M$  erfolgte anhand des Maximums der ersten Ableitung der Schmelzkurven. Um eine intermolekulare Hybridisierung auszuschließen, wurden Proben verschiedener Konzentrationen gemessen. Es wurden vorwiegend folgende Konzentrationen verwendet: 10, 7.5, 5, 2.5 und 1.25  $\mu\text{M}$ .

### Statische Fluoreszenzspektroskopie

Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren und -kinetiken erfolgte in 200  $\mu\text{l}$  Fluoreszenzküvetten (105.250-QS, 10 x 2 mm von *Hellma*) mit einem Cary Eclipse Fluoreszenzspektrometer der Firma *Varian*. Als Messmedium wurde entsprechend des Zielmoleküls ein entgaster, mit Argon gesättigter, wässriger Puffer verwendet (SH2-Domänen: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7.4; MMP-7: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4). Die Messparameter wurden entsprechend der Farbstoffkombination variiert:

FAM-Dabcyl:  $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 500\text{-}700 \text{ nm}$

Pyr-Pyr:  $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 360\text{-}600 \text{ nm}$ .

Vor jeder Anwendung wurden die Mutterlösungen der Sonden auf mindestens 80 °C erhitzt und langsam auf 25 °C abgekühlt, um eine fehlerfreie Hybridisierung zu gewährleisten. Die Schlitzbreiten wurden entsprechend der verwendeten Konzentration und Konjugate angepasst.

Die kinetischen Fluoreszenzmessungen im *Well Plate*-Format wurden mit dem Victor<sup>TM</sup> X5 *Multilabel Plate Reader* der Firma *PerkinElmer* in einem OptiPlate384 von *Greiner* mit folgenden Parametern durchgeführt:  $\lambda_{ex} = 355$  nm,  $\lambda_{em} = 460$  nm, 1.0 s Messzeit, Lichtenergie 1401.

Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren im *Well Plate*-Format erfolgte mit dem *Plate Reader SynergyMx* der Firma *BioTek* in einem OptiPlate384 von *Greiner* mit folgenden Parametern:  $\lambda_{ex} = 340$  nm,  $\lambda_{em} = 360$ -600 nm in 1 nm-Schritten, 9 nm Schlitzbreiten, normale Lesegeschwindigkeit, 8 mm Lesehöhe, Verstärkung 100.

Die thermischen Denaturierungsexperimente wurden in 1 ml Fluoreszenzküvetten (114F-QS, 10 x 4 mm von *Hellma*) mit entgastem, Ar-gesättigtem Puffer (140 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4 oder 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4) durchgeführt. Um eine intermolekulare Hybridisierung auszuschließen, wurden Proben verschiedener Konzentrationen (4, 2, 1 und 0.5  $\mu$ M) gemessen.

### Zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie

Die zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen erfolgten mit einem FLS920 Fluoreszenzspektrometer von *Edinburgh Instruments* und der EPLED-280 (40  $\mu$ W) von *Edinburgh Photonics* als Anregungsquelle bei einer Wiederholungsrate von 1 MHz in Fluoreszenzküvetten (105.250-QS, 10 x 2 mm von *Hellma*). Die Abklingkurven wurden bei 25 °C mit einem Mikrokanal-Detektor (4096 Kanäle im Zeitbereich von 1  $\mu$ s) und einem Monochromator mit Vis-Gitter bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{em} = 480$  nm mit einer Schlitzbreite von 20 nm aufgenommen. Die Rohdaten wurden mit dem Programm F900 (*Edinburgh Instruments*) aufgezeichnet und mit Microsoft Excel 2010 ausgewertet. Dabei wurde die Basislinie ( $t = 500$ -1000 ns) von den Einzelwerten subtrahiert und der Anfangsimpuls auf  $t = 0$  ns gesetzt, bevor die logarithmische Auftragung gegen die Zeit erfolgte. Die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  wurde mithilfe dem Programm FAST von *Edinburgh Instruments* bestimmt. Die Fluoreszenzintensität wurde aus dem Integral der Werte in einem bestimmten Zeitintervall ermittelt.

Als Messmedium wurde ein entgaster, mit Argon gesättigter, wässriger Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.05 % (w/v) CHAPS, pH 7.4), das Zellmedium DMEM\*, Humanserum bzw. diverse Mischungsverhältnisse aus Puffer und Humanserum verwendet. Vor jeder Anwendung wurden die Mutterlösungen der Sonden auf mindestens 80 °C erhitzt und langsam auf 25 °C abgekühlt, um eine fehlerfreie Hybridisierung zu gewährleisten.

Vor Messbeginn wurde zur Überprüfung des Gerätes der IRF (*instrument re-*



sponse function) unter Verwendung einer Ludox<sup>®</sup>HS-40-Suspension von *Sigma Aldrich* bei  $\lambda_{ex} = 280$  nm und  $\lambda_{em} = 280$  nm aufgenommen.

### Fluoreszenzanisotropie

Die Anisotropiemessungen wurden bei 25 °C mit einem Spex Fluoromax 3-Fluoreszenzspektrometer (*HORIBA Jobin Yvon*), der mit einem Peltier-wärmegeregelten Einzellenhalter und automatischen Polarisatoren ausgestattet ist, durchgeführt. Es wurde eine 1 ml Fluoreszenzküvette (119.004F-QS, 10 x 4 mm von *Hellma*) mit einem Magnetrührfisch bzw. eine 200  $\mu$ l Fluoreszenzküvette (105.250-QS, 10 x 2 mm von *Hellma*) verwendet. Die Schlitzbreiten bei vertikal zueinander ausgerichteten Polarisatoren wurden so eingestellt, dass die Intensität der vorgelegten Lösung des FAM-markierten Peptids ca.  $1 \cdot 10^6$  betrug. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{ex} = 485$  nm, die Aufnahme der Emissionssignale bei  $\lambda_{em} = 520$  nm. Pro Messpunkt wurden so viele Datenpunkte aufgenommen bis eine Konstanz der Intensitätswerte zu verzeichnen war. Für die Auswertung mit der GraphPad Prism-Software (Version 5.03) wurden diese Werte für jeden Messpunkt gemittelt.

## 6.2 Allgemeine Synthesevorschriften

### 6.2.1 Polymere Trägermaterialien

#### Rinkamid-Harz

Für die Fmoc-basierte Festphasensynthese wurde ein Rinkamid-Harz (Tentagel R RAM, *Rapp Polymers*) mit einer Beladung von  $0.19 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1}$  verwendet. Dieses wurde vor dem Einsatz in der manuellen Synthese vollständig mit Fmoc-Glycin-OH beladen. Dafür wurden 500 mg Harz ca. 1 h in DMF quellen lassen, bevor die Kupplung mit 4 Äq. Fmoc-Glycin-OH ( $380 \mu\text{mol}$ ), 3.6 Äq. HCTU ( $342 \mu\text{mol}$ ), 8 Äq. NMM ( $760 \mu\text{mol}$ ) in einer 0.2 M DMF-Lösung für 90 min erfolgte. Das Reaktionsgemisch wurde vor der Zugabe zum Harz 4 min geschüttelt. Die Prozedur wurde nach diversen Waschschritten (5x DMF, 5x  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 5x DMF) wiederholt, bevor die Beladung photometrisch überprüft wurde. Das Harz wurde bei quantitativer Beladung zweimalig für 3 min mit einem Gemisch aus 5 %  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 6 % 2,6-Lutidin in DMF behandelt. Das Harz wurde abschließend gründlich mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen, im Hochvakuum getrocknet und bei 4 °C aufbewahrt. Für die automatisierte Synthese wurde das unbeladene Harz eingesetzt und vor der Verwendung ca. 1 h in DMF quellen lassen.

### MBHA-Harz

Die gemischte Festphasensynthese der *IS-HPBs* wurde an einem MBHA·HCl-Harz ( $1.2 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ , *Novabiochem*) durchgeführt, das zuvor mit Fmoc-Glycin-OH beladen wurde. Dafür wurden 250 mg Harz ca. 1 h in DMF geschüttelt und anschließend gründlich mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen, bevor die Deprotonierung durch zweimaliges, 10-minütiges Schütteln in 5-prozentiger DIPEA-Lösung in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  erfolgte. Die Kupplung mit 1 Äq. Fmoc-Glycin-OH ( $100 \mu\text{mol}$ ), 1 Äq. PyBOP ( $100 \mu\text{mol}$ ), 3 Äq. NMM ( $300 \mu\text{mol}$ ) in einer 0.1 M DMF-Lösung wurde über Nacht durchgeführt. Nach diversen Waschschritten (5x DMF, 10x  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) wurde die Beladung photometrisch bestimmt. Das Harz wurde bei zufriedenstellender Beladung ( $0.21\text{--}0.28 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) zweimalig für 3 min mit einem Gemisch aus 5%  $\text{Ac}_2\text{O}$ , 6% 2,6-Lutidin in DMF behandelt. Abschließend wurde das Harz gründlich mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen, im Hochvakuum getrocknet und bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 6.2.2 Manuelle Festphasensynthese

Je nach Synthesemaßstab wurde die entsprechende Menge des Harzes in PET-Spritzenreaktoren (2 ml, Teflonfritte mit  $50 \mu\text{m}$  Porengröße) der Firma *MultiSyn-Tech* überführt und unter Schütteln für mindestens 30 min in 2 ml DMF quellen lassen. Die Ausbeute des jeweiligen Syntheseansatzes wurde anhand der Beladung berechnet, die die erstmalige Fmoc-Abspaltung ergab.

#### Sequenzaufbau nach der Fmoc/Bhoc-Strategie

Die großen Syntheseansätze der unmarkierten PNA-Peptid-Konjugate wurde manuell unter Verwendung der Fmoc/Bhoc-Strategie hergestellt.

*Fmoc-Abspaltung:* Das Harz wurde 3 min in 1 ml Piperidin/DMF-Lösung (1:4, v:v) geschüttelt und zweimal mit diesem Gemisch gewaschen. Die Abspalllösung wurde verwendet, um eine Reaktionskontrolle durchzuführen. Anschließend wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 5x DMF).

*Kupplung einer Aminosäure:* Die AS (4 Äq.) wurde zunächst in trockenem DMF ( $c_{\text{AS}} = 0.1 \text{ M}$ ) gelöst und mit 8 Äq. NMM und 3.6 Äq. HCTU versetzt. Nach 4 min wurde diese Lösung auf den Spritzenreaktor aufgezogen und für 30 min geschüttelt. Bei Bedarf wurde die Prozedur wiederholt. Anschließend wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 5x DMF).

*Kupplung eines PNA-Monomers:* Eine Lösung aus 4 Äq. PNA-Monomer, 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM in trockenem DMF ( $c_{\text{PNA-Monomer}} = 0.1 \text{ M}$ ) wurde auf den Spritzenreaktor aufgezogen und für 30 min geschüttelt. Bei Bedarf wurde die

Prozedur wiederholt. Anschließend wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF).

*Acetylierung primärer Aminofunktionen:* Das Harz wurde in einer Lösung aus 5 % Ac<sub>2</sub>O und 6 % 2,6-Lutidin in DMF zweimal 3 min geschüttelt und mit 5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF gewaschen.

### Sequenzaufbau nach der Boc/Z-Strategie

Die C-terminalen PNA-Segmente der *IS-HPBs* wurden unter Verwendung der Boc/Z-Strategie aufgebaut, bevor die Sequenz in einer automatisierten Synthese vervollständigt wurde.

*Boc-Abspaltung:* Das gequollene und mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gründlich gewaschene Harz wurde 5 min mit einer 5-prozentigen Lösung von *m*-Kresol in TFA behandelt. Anschließend wurde das Harz gewaschen (5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1x 1 % NMM in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF).

*Kupplung eines PNA-Monomers:* Eine Lösung aus 4 Äq. PNA-Monomer, 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM in trockenem DMF ( $c_{\text{PNA-Monomer}} = 0.1 \text{ M}$ ) wurde auf den Spritzenreaktor aufgezogen und für 30 min geschüttelt. Bei Bedarf wurde die Prozedur wiederholt. Anschließend wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF).

*Acetylierung primärer Aminofunktionen:* Das Harz wurde in einer Lösung aus 5 % Ac<sub>2</sub>O und 6 % 2,6-Lutidin in DMF zweimal 3 min geschüttelt und mit 5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF gewaschen.

### Einführung der Chromophore

Die Dabcyl-Gruppe wurde mithilfe des in der Arbeitsgruppe synthetisierten Monomers Fmoc-K(Dabcyl)-OH (**37**) während der automatisierten Synthese in die Sequenz eingebaut. Die Einführung von Cl1Anthr in das C-terminale PNA-Segment der *IS-HPBs* erfolgte während der Boc-basierten Festphasensynthese. Die manuell oder automatisiert hergestellten Vollängenprodukte der FAM/Dabcyl-markierten PNA-Peptid-Konjugate und *IS-HPBs* wurden mit den fehlenden Chromophoren nach der Abspaltung der entsprechenden Schutzgruppen in einer manuellen Synthese komplettiert. Nach der Kupplung der Chromophore wurde das Harz in einer Lösung aus 5 % Ac<sub>2</sub>O und 6 % 2,6-Lutidin in DMF zweimal 3 min geschüttelt, um nicht umgesetzte Aminofunktionen zu acetylieren. Das Harz wurde 5x mit DMF und gründlich mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen.

*Mmt-Abspaltung:* Das gequollene und mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gründlich gewaschene Harz wurde zweimal 2 min mit einer Lösung von 2 % TFA und 5 % TIS in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> behan-

delt. Anschließend wurde das Harz gewaschen (5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF).

*Kupplung von FAM:* Eine Lösung mit 4 Äq. 5(6)-Carboxyfluorescein, 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM in trockenem DMF ( $c \approx 0.05$  M) wurde auf den Spritzenreaktor aufgezogen und für 2 h geschüttelt. Die Prozedur wurde zweimal nach Waschen des Harzes (3x DMF, 3x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3x DMF) wiederholt. Anschließend wurde das Harz mehrfach mit Piperidin/DMF-Lösung (1:4, v:v) und abschließend mit 5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF gewaschen.

*Boc-Abspaltung:* Das gequollene und mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gründlich gewaschene Harz wurde 5 min mit einer 5-prozentigen Lösung von *m*-Kresol in TFA behandelt. Anschließend wurde das Harz gewaschen (5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1x 1 % NMM in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF).

*Kupplung von C1Anthr:* Eine Lösung mit 10 Äq. Anthrachinon-2-carbonsäure, 9 Äq. HCTU und 20 Äq. NMM in trockenem DMF ( $c \approx 0.1$  M) wurde 4 min geschüttelt, bevor sie auf den Spritzenreaktor aufgezogen und für 2 h geschüttelt wurde. Die Prozedur wurde zweimal nach Waschen des Harzes (3x DMF, 3x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3x DMF) wiederholt. Anschließend wurde das Harz erneut gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF).

*Alloc-Abspaltung:* Das gequollene Harz wurde gründlich mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> und abschließend mit entgastem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in einer Ar-Atmosphäre gewaschen. Der Kationenfänger 1,3-Dimethylbarbitursäure (DMBA, 10 Äq.) wurde in entgastem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst ( $c_{DMBA} \approx 0.2$  M) und auf den Spritzenreaktor aufgezogen. Anschließend wurde 1 Äq. Pd-Komplex Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> in entgastem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst ( $c_{Pd(PPh_3)_4} \approx 0.02$  M) und ebenfalls aufgezogen. Das Gemisch wurde 30 min geschüttelt. Nach einem Waschprozedur (5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF, 5x entgastes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) wurde der Vorgang wiederholt. Abschließend wurde das Harz gewaschen (5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF, 2x Dioxan/H<sub>2</sub>O (9:1, v:v), 1x MeOH, 5x DMF).

*Kupplung von C2Pyr:* Eine Lösung mit 10 Äq. 1-Pyrenessigsäure, 10 Äq. PyBOP und 20 Äq. NMM in trockenem DMF ( $c \approx 0.1$  M) wurde auf den Spritzenreaktor aufgezogen und für 6-8 h geschüttelt. Die Prozedur wurde nach Waschen des Harzes (3x DMF, 3x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3x DMF) wiederholt. Anschließend wurde das Harz erneut gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF). Bei den excimerbasierten Sonden wurden die doppelten Äquivalente verwendet.

*Kupplung von C4Pyr:* Eine Lösung mit 10 Äq. 1-Pyrenbuttersäure in trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ( $c \approx 0.1$  M) wurde auf 0 °C gekühlt und mit 5 Äq. Diisopropylcarbodiimid versetzt. Nach 20 min wurde die Lösung eingeeengt und der Rückstand in trockenem DMF ( $c \approx 0.1$  M) aufgenommen. Die Lösung wurde auf den Spritzenreaktor auf-

gezogen und für 6-8 h geschüttelt. Die Prozedur wurde nach Waschen des Harzes (3x DMF, 3x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3x DMF) wiederholt. Anschließend wurde das Harz erneut gewaschen (5x DMF, 5x CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 5x DMF).

### 6.2.3 Automatisierte Festphasensynthese

Die unmarkierten Peptide und PNA-Peptid-Konjugate, das Grundgerüst der FAM/Dabcyl-markierten Peptide und PNA-Peptid-Konjugate, das Grundgerüst der C2Pyr/C1Anthr-markierten Peptide, sowie das Peptid-Segment und *N*-terminale PNA-Segment der *IS-HPBs* wurden automatisiert mit einem ResPep-Parallel-Synthesizer der Firma *Intavis* hergestellt. Die Synthesemethoden wurden durch Variation der Parameter, u.a. Kupplungszeiten und -wiederholungen, dem entsprechenden Produkt angepasst. Die Volumina des geschilderten Synthesesyklus beziehen sich auf einen 2  $\mu$ mol Ansatz und wurden bei Bedarf variiert. Als Reaktor fungierte eine 350  $\mu$ l-Spitze mit eingesetzter Fritte. Je nach Synthesemaßstab wurde die entsprechende Menge des Harzes in den Spitzenreaktor überführt und für mindestens 30 min in DMF quellen lassen. Die Ausbeute der automatisierten Synthesen wurde bzgl. der Einwaage des unbeladenen Harzes berechnet. Für die Sequenzanalogie zu manuell hergestellten Sonden wurde die Sequenz des automatisiert hergestellten PNA-Peptid-Konjugats um ein *C*-terminales Glycin erweitert.

Die Aminosäuren, PNA-Monomere und Aktivator (HCTU oder HBTU) wurden zunächst eingewogen und in dem entsprechenden Volumen an NMP gelöst ( $c_{\text{PNA-Monomer}} = 0.2 \text{ M}$ ,  $c_{\text{Aktivator}} = 0.4 \text{ M}$ ). Die Stammlösungen der Aminosäuren ( $c_{\text{AS}} = 0.3 \text{ M}$ ) wurden mit einer 0.3 M HOBt-Lösung in NMP hergestellt. Die Base NMM wurde in DMF gelöst ( $c_{\text{NMM}} = 4 \text{ M}$ ).

Ein Synthesesyklus beinhaltete die Fmoc-Entschützung, Kupplung eines Monomers und die Acetylierung nicht umgesetzter *N*-Termini. Nach jedem Schritt wurden die Lösungen mithilfe einer Membranpumpe entfernt und das Harz gründlich mit abnehmenden Volumina an DMF (300-200  $\mu$ l) gewaschen. Die *Fmoc-Entschützung* erfolgte mit einer Piperidin/DMF-Lösung (1:4, v:v) zweimal 2 min (je 200  $\mu$ l). Es wurden bei den *Kupplungen* 6 Äq. AS, 5.4 Äq. Aktivator<sub>AS</sub>, 4 Äq. PNA-Monomer, 3.6 Äq. Aktivator<sub>PNA-Monomer</sub> und 12 Äq. NMM verwendet. Die berechneten Volumina für die Kupplungslösung wurden aufgezo- gen und mehrfach durchmischt. Nach 4 min Voraktivierung wurde sie auf das Harz gegeben. Die Aminosäuren wurden in der Regel einmal 30 min gekuppelt. Die Aminosäuren Fmoc-K(Mmt)-OH, Fmoc-K(Dabcyl)-OH (**37**) und Fmoc-K(Alloc)-OH wurden zweimal je 30 min gekup-

pelt. Bei dem *C*-terminalen PNA-Segment wurden Doppelkupplungen (je 45 min) und beim *N*-terminalen PNA-Segment, sowie der *N*-terminalen AS-Sequenz Dreifachkupplungen (je 45 min) eingestellt. Um nicht umgesetzte *N-Termini* zu *acetylieren*, wurde das Harz zweimal 2 min mit einem Gemisch aus 5 %  $\text{Ac}_2\text{O}$  und 6 % 2,6-Lutidin in DMF (je 200  $\mu\text{l}$ ) versetzt. Durch die Wiederholung des Synthesesykluses wurde die vorgegebene Sequenz sukzessiv aufgebaut. Nach vollendeter Elongation wurde das trockene Harz in Spritzenreaktoren zur weiteren Behandlung überführt.

### 6.2.4 Isolierung und Reinigung der Endprodukte

Vor der Freisetzung vom polymeren Trägermaterial wurde das gequollene Harz gründlich mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen. Für 40 mg Harz mit einer Beladung von 0.2 mmol·g<sup>-1</sup> wurde 1 ml Abspalllösung verwendet. Das Volumen wurde an die entsprechende Ansatzgröße angepasst. Die Abspalllösung wurde vorsichtig auf den Spritzenreaktor aufgezogen, um einer starken Gas- und Wärmeentwicklung entgegenzuwirken.

*Freisetzung vom Rinkamid-Harz:* Das Harz wurde mit der Abspalllösung (TFA:H<sub>2</sub>O:TIS, 90:5:5, v:v:v) versetzt und 90 min geschüttelt. Die Lösung wurde in ein 15 ml-Gefäß überführt und das Harz dreimal mit TFA (je 200  $\mu\text{l}$ ) gewaschen. Für die Abspaltung der *N,N*-Dimethylamino-Schutzgruppe des Phosphotyrosins wurden die vereinigten TFA-Lösungen mit 10 Vol-% Wasser versetzt und über Nacht (mindestens 8 h) geschüttelt.

*Freisetzung vom MBHA-Harz:* Das Harz wurde zweimal 15 min mit einem TFA:H<sub>2</sub>O-Gemisch (95:5, v:v) (je 250  $\mu\text{l}$ ) bei 4 °C geschüttelt und die Lösungen verworfen, bevor die Endabspaltung mit einem TFA:TFMSA:*m*-Kresol-Gemisch (5:1:1, v:v:v) (je 450  $\mu\text{l}$ ) zweimal 45 min bei 4 °C erfolgte. Die Lösungen wurden in einem 15 ml-Gefäß vereinigt und das Harz dreimal mit TFA (je 200  $\mu\text{l}$ ) gewaschen. Die Abspaltung der *N,N*-Dimethylamino-Schutzgruppe des Phosphotyrosins wurde nach der Fällung vorgenommen.

*Isolierung des Fmoc-geschützten Produkts:* Die Abspalllösung wurde auf Trockeneis vorgekühlt und mit einem 10-fachen Volumen vorgekühlten Diethylether versetzt. Nach 15 min auf Trockeneis wurde die Probe zentrifugiert (4 °C, 4300 rpm, 15 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dreimal mit Diethylether gewaschen, bevor es im Vakuum getrocknet wurde. Das Rohprodukt wurde anschließend in einem H<sub>2</sub>O:MeCN-Gemisch (2:1-1:1, v:v) gelöst. Die *N,N*-Dimethylamino-Schutzgruppe des Phosphotyrosins wurde im Falle der *IS-HPBs* durch Zugabe von

10 Vol-% TFA und Schütteln über Nacht entfernt. Das Produkt wurde mithilfe der (semi)präparativen HPLC gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und mithilfe eines Vakuumkonzentrators und eines Lyophilisators zur Trockne eingengt.

*finale Fmoc-Abspaltung und Isolierung des Endprodukts:* Das Fmoc-geschützte Produkt wurde in 100-200  $\mu\text{l}$  eines Piperidin/ $\text{H}_2\text{O}$ -Gemischs (1:1, v:v) gelöst und 5 min geschüttelt. Unter Eiskühlung wurde vorsichtig 100  $\mu\text{l}$  TFA zugetropft. Die Fällung des Rohprodukts erfolgte durch Zugabe von 1 ml kalten Diethylether. Nach 15 min bei  $-20^\circ\text{C}$  wurde die Probe zentrifugiert ( $25^\circ\text{C}$ , 13400 rpm, 5 min) und der Überstand verworfen. Das mit Diethylether gewaschene Pellet wurde in einem  $\text{H}_2\text{O}$ :MeCN-Gemisch (2:1-1:1, v:v) gelöst und mithilfe der (semi)präparativen HPLC gereinigt. Die Produktfraktionen wurden vereinigt und mithilfe eines Vakuumkonzentrators und eines Lyophilisators bis zur Trockne eingengt. Das Reinheit des Produkts wurde mit einer analytischen Chromatographie, die mit einem Massenspektrometer gekoppelt war, überprüft.

## 6.3 Molekularbiologische Arbeit

Sämtliche molekularbiologischen Arbeiten wurden in einem gentechnischen Labor der Sicherheitsstufe 1 durchgeführt. Die verwendeten Geräte und Materialien wurden vor und nach deren Gebrauch autoklaviert oder sterilisiert. Es wurden ausschließlich Produkte mit molekularbiologischen Reinheitsgrad und sterilfiltrierte Lösungen verwendet. Sämtliche Nährmedium wurden mit dem Antibiotikum Ampicillin (Amp) zu einer Endkonzentration von  $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  versetzt, gegen das der eingesetzte Bakterienstamm eine Resistenz aufwies.

Bakterienstamm:	BL21(DE3) Singles <sup>TM</sup> ( <i>Novagen</i> )	
Expressionsvektor:	pGEX-4T-1	
Src SH2:	gallus gallus Src, aa 142-246, N243T	Gene ID: 396442
Lck SH2:	human Lck, aa 123-228	Gene ID: 3932

### Medien, Puffer und Lösungen

LB	10 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Trypton, 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Hefeextrakt, 5 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl 20 g LB auf 1 l Medium
TB	12 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Casein (enzymatisch verdaut), 24 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Hefeextrakt, 9.4 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 47.6 g TB + 10 g Glycerol auf 1 l Medium

Amp	50 mg·ml <sup>-1</sup> in H <sub>2</sub> O:EtOH (1:1)
SOC-Medium	5 g·l <sup>-1</sup> Hefeextrakt, 20 g·l <sup>-1</sup> Trypton, 20 mM Glukose, 0.6 g·l <sup>-1</sup> NaCl, 0.2 g·l <sup>-1</sup> KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub>
IPTG	0.1 M in H <sub>2</sub> O
Pefabloc® SC	5 mg·ml <sup>-1</sup> in EtOH
Standardpuffer	30 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 3 mM DTT, pH 7.5
Hochsalz-ATP-Puffer	Standardpuffer, 400 mM KCl, 1 mM ATP, pH 7.5
Elutionspuffer	Standardpuffer, 10 mM Glutathion, pH 7.5
Ladepuffer	50 mM Tris·HCl (pH 6.8), 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 100 mM DTT
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, pH 8.3
Coomassie-Lösung	0.25 g Coomassie Brilliant Blue G250 in 100 ml MeOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (5:4:1), filtriert
Entfärbelösung	MeOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (5:4:1)
HEPES-Puffer	20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β-ME, pH 7.5
MOPS-Puffer	20 mM MOPS, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β-ME, pH 7.2
Phosphat-Puffer	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β-ME, pH 7.4

### Plasmidtransformation

Die Herstellung eines Expressionsvektors für GST-Lck SH2, der die notwendige cDNA enthielt, wurde bei *GenScript* in Auftrag gegeben. Das Plasmid (4 µg) wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst, um eine 200 ng·µl<sup>-1</sup> Lösung anzufertigen. Die Transformation erfolgte mit einer 50-fachen Verdünnung in den kompetenten *E. coli* Bakterienstamm BL21(DE3) unter Anwendung des Protokolls von *Novagen*. Ein Aliquot der Zellen wurde auf Eis aufgetaut und vorsichtig geschüttelt, um eine homogene Vermischung zu erreichen. Anschließend wurde 1 µl der DNA-Lösung zugegeben und leicht geschüttelt. Das Gefäß wurde 5 min auf Eis gelagert, bevor es 30 s in einem 42 °C warmen Thermoschüttler und erneut 2 min auf Eis platziert wurde. Nach diesem Temperaturschock wurde bei Raumtemperatur 250 µl eines SOC-Nährmediums zugegeben und die Lösung mit einer Impföse auf mit LB/Amp-Medium beschichteten Petrischalen ausgestrichen, um eine Einzelkolonie zu isolieren und damit eine Glycerinkultur zu erstellen.



### Anlegen von Glycerinkulturen

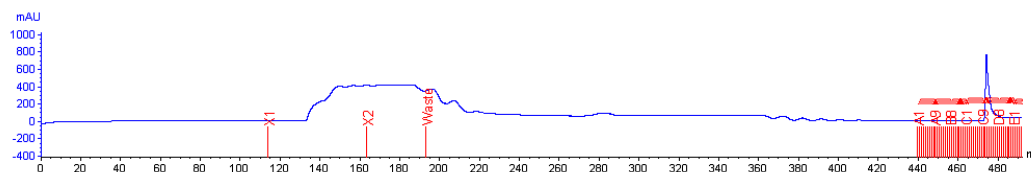
Für die Expression von GST-Src SH2 wurde eine bereits in der Arbeitsgruppe Seitz vorhandene Glycerinkultur aus BL21(DE3)-Zellen mit dem notwendigen Plasmid verwendet, deren Konzentration und Qualität zunächst unbekannt war. Diese Kultur wurde mit einer Impföse auf mit LB/Amp-Medium beschichteten Petrischalen in verschiedenen Verdünnungen ausgestrichen. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde eine Einzelkolonie gepickt und eine Vorkultur in LB/Amp-Medium angelegt. Nach weiteren 12 h Inkubationszeit bei 37 °C wurden je 800 µl der Bakteriensuspension mit 200 µl eines Glycerin:H<sub>2</sub>O-Gemisches (4:1, v:v) verdünnt. Die Mischungen wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### Expression der SH2-Domänen als GST-Fusionsproteine

Mit je einer Impföse wurden aus der aufgetauten Glycerinkultur 8x 2.5 ml LB/Amp-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 380 rpm inkubiert. Diese Vorkulturen wurden in 8x 250 ml TB/Amp-Medium überführt und in Schikanekolben bis zu einem OD<sub>600nm</sub> ≈ 0.6 bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und die Bakterienkultur über Nacht bei 20 °C und 160 rpm geschwenkt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4300 rpm, 4 °C, 15 min) geerntet. Das Zellpellet wurde mit Standardpuffer gewaschen und mit 2 ml pro g Zellen suspendiert, bevor diese bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert wurden.

### Isolierung und Aufreinigung der SH2-Domänen als GST-Fusionsproteine

Die aufgetauten Zellsuspensionen wurden mit 0.001 v% Pefabloc® SC versetzt und mit einem diskontinuierlichen Hochdruckhomogenisators (*French Press* von *Thermo Scientific*, 1000 psi, 3x) lysiert. Die Suspension wurde ultrazentrifugiert (45000 g, 30 min, 4 °C), der Überstand abpipettiert und die GST-Konzentration im Lysat mithilfe eines Mikrovolumenphotometers bestimmt. Dabei entspricht A<sub>280nm</sub> ≈ 1 ungefähr 0.5 mg·l<sup>-1</sup> an GST-Fusionsprotein. Entsprechend der Menge an aufzureinigenden Protein wurden gegebenenfalls mehrere GST-Affinitätssäulen in einem FPLC-System in Reihe geschaltet. Die Verfolgung der Aufreinigung erfolgte mittels der Absorption bei 280 nm (Abbildung 6.1). Das System wurde zunächst mit Standardpuffer bei einer Flussrate von 2-4 ml·min<sup>-1</sup> äquilibriert, bevor die Beladung mit dem Lysat bei einer Flussrate von 0.5 ml·min<sup>-1</sup> erfolgte. Der Ausfluss (X1,2) wurde aufgefangen und auf eventuell enthaltenes Protein gelchromatographisch untersucht. Die beladenen Säulen wurden anschließend mit Standardpuffer und mit Hochsalz-ATP-Puffer mit einer Flussrate von 2-4 ml·min<sup>-1</sup> gespült, um unspezifische an das Gluta-



**Abbildung 6.1:** Elutionsprofil einer FPLC-Aufreinigung am Beispiel von GST-Src SH2. Messung der Absorption bei 280 nm.

thion oder an das Fusionsprotein gebundene Chaperone abzutrennen. Abschließend wurde mit Standardpuffer bei einer Flussrate von  $2\text{--}4\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  bis zum Erreichen der Basislinie gespült. Sämtliche Spüllösungen wurden aufgefangen und ebenfalls auf eventuell enthaltenes Protein gelchromatographisch untersucht. Die Elution erfolgte mit einem Puffer mit Glutathion-Zusatz bei einer Flussrate von  $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt und gelchromatographisch untersucht. Das System wurde vor längeren Ruhezeiten mit Wasser und abschließend mit 20 % EtOH gespült. Die Fraktionen mit dem gewünschten Fusionsprotein wurden vereinigt und eine Dialyse gegen den jeweiligen Messpuffer (HEPES-, MOPS- oder Phosphatpuffer) durchgeführt. Die Lösung wurde ultrazentrifugiert ( $65000\text{ g}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ,  $15\text{ min}$ ), der Überstand aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ . Die Konzentrationen wurden mithilfe eines Mikrovolumenphotometers und literaturbekannten Extinktionskoeffizienten ( $\varepsilon_{280\text{ nm},\text{GST-Src SH2}} = 54890\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ,  $\varepsilon_{280\text{ nm},\text{GST-Lck SH2}} = 54150\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )<sup>[180]</sup> bestimmt.

### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die aufgefangenen Spüllösungen, sowie die eluierten Fraktionen wurden unter Verwendung der denaturierenden Gelelektrophorese mit einem 10-prozentigen Trenngel und einem 5-prozentigen Sammelgel analysiert (Tabelle 6.2). Die Proben wurden in

**Tabelle 6.2:** Zusammensetzung der denaturierenden Gelpräparationen.

	10 % Trenngel	5 % Sammelgel
H <sub>2</sub> O	4.68 ml	3.70 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.60 ml	-
1.0 M Tris (pH 6.8)	-	0.60 ml
40 % Acrylamidlg. (19:1) (Acrylamid: <i>N,N'</i> -Methylenbisacrylamid)	2.50 ml	0.60 ml
10 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O	100 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
10 % (w/v) APS in H <sub>2</sub> O	100 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
TEMED	4 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$

einem 1:9-Verhältnis mit dem denaturierenden Ladepuffer verdünnt, bevor sie 5 min mit heißem Wasser und abschließend mit Eis behandelt wurden. In die Geltaschen wurden jeweils 10  $\mu$ l aufgetragen. Als Massestandard wurde der SDS-PAGE MW Standards *low range* von *Bio-Rad* verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte 15 min bei 80 V und 50 min bei 150 V. Das 10x10 cm große Gel wurde mit der Coomassie-Lösung 60 min angefärbt. Die Entwicklung erfolgte durch Schütteln (3x 30 min) in der Entfärbelösung. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem Scanner HP Scanjet 5590.

## 6.4 Bestimmung von $K_D$ -Werten mittels Fluoreszenzanisotropie

Die Bindungsaffinitäten der isolierten SH2-Domänen wurden bzgl. des Referenzpeptids FAM-GpYEEIA-NH<sub>2</sub> (512.8  $\mu$ M in 1 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg.) mithilfe eines Fluoreszenzanisotropie-Assays bestimmt. Dafür wurde zunächst 20 nM des Referenzpeptid in dem jeweiligen Messpuffer (Src SH2: 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7.4 oder 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7.4; Lck SH2: 20 mM MOPS, 50 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7.2) in 1 ml Fluoreszenzküvetten (119.004F-QS, 10 x 4 mm von *Hellma*) mit einem Magnetrührfisch vorgelegt. Im Falle der GST-Src SH2-Domäne im Phosphat-Puffer wurde eine 200  $\mu$ L Küvette verwendet, um höhere Endkonzentrationen zu erreichen und somit eine Sättigung zu gewährleisten. Zu dieser Lösung wurde eine 25  $\mu$ M Proteinelösung in dem jeweiligen Messpuffer manuell zutitriert. Die dabei ermittelten Fluoreszenzanisotropiewerte wurden normiert und gegen die volumenkorrigierte Proteinkonzentration aufgetragen. Der  $K_D$ -Wert wurde mittels nichtlinearer Regression mit der GraphPad Prism-Software (Version 5.03) und der Titrationsgleichung (Gleichung 6.4<sup>[83]</sup>) bestimmt. Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

$$r = r_f + (r_g - r_f) \times \frac{(L + K_D + P) - \sqrt{(L - K_D - P)^2 - 4LP}}{2L} \quad (6.2)$$

$r$  - gemessene Anisotropie

$L$  - Gesamtkonzentration des Liganden

$r_f$  - Anisotropie des freien Liganden

$P$  - Gesamtkonzentration an Protein

$r_g$  - Anisotropie des gebundenen Liganden

## 6.5 Versuche zur sequenzinternen Fluoreszenzmarkierung

### **H-DD-K(FAM)-*gttg*-PQpYEEIPI-*caac*-K(Dabcyl)-G-NH<sub>2</sub> (34)**

Das Produkt wurde im 2  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert. Die Kupplung von FAM wurde entsprechend der Vorschrift in Kapitel 6.2.2 durchgeführt.

Ausbeute: 24.8 OD<sub>260 nm</sub> (250 nmol, 13 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 99200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 9.8 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 4388.30 (C<sub>190</sub>H<sub>237</sub>N<sub>66</sub>O<sub>57</sub>P)  
gefunden: 4388.63

### **H-DD-*gttg*-K(FAM)-PQpYEEIPI-K(Dabcyl)-*caac*-G-NH<sub>2</sub> (35)**

Das Produkt wurde im 2  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert. Die Kupplung von FAM wurde entsprechend der Vorschrift in Kapitel 6.2.2 durchgeführt.

Ausbeute: 39.2 OD<sub>260 nm</sub> (395 nmol, 20 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 99200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 10.3 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 4388.30 (C<sub>190</sub>H<sub>237</sub>N<sub>66</sub>O<sub>57</sub>P)  
gefunden: 4388.41

### **H-K(FAM)-PQpYEEIPI-K(Dabcyl)-G-NH<sub>2</sub> (36)**

Das Produkt wurde im 2  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert. Die Kupplung von FAM wurde entsprechend der Vorschrift in Kapitel 6.2.2 durchgeführt.

Ausbeute: 34.8 OD<sub>492 nm</sub> (446 nmol, 22 %);  $\varepsilon_{492 nm} = 78000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 11.9 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 210 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 1990.07 (C<sub>96</sub>H<sub>121</sub>N<sub>18</sub>O<sub>27</sub>P)  
gefunden: 1990.02

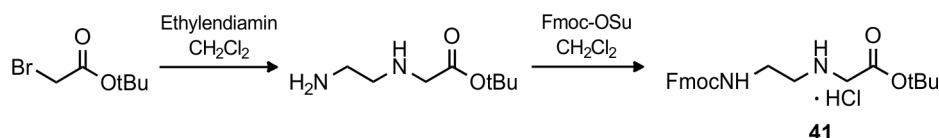
## Fluoreszenzspektroskopische Messungen

Sämtliche Messungen wurden in entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem Phosphat-Puffer (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM  $\text{NaCl}$ , 2 mM DTT, pH 7.4) bei 25 °C durchgeführt. Die Stammlösungen der Sonden wurden mit einem  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ -Gemisch (1:1, v:v) zu einer 20  $\mu\text{M}$  Konzentration verdünnt, auf 85 °C erhitzt und langsam auf 25 °C abgekühlt. Anschließend wurde 150  $\mu\text{l}$  Lösung einer 2  $\mu\text{M}$  Konzentration der jeweiligen Sonde in Puffer hergestellt. Die Konzentrationen wurden am UV-Spektrometer mithilfe der Absorption bei 260 nm geprüft und gegebenenfalls angepasst. Die Fluoreszenzmessungen wurden bei einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$  (Filter: 335-620 nm) mit 5 nm Schlitzbreite durchgeführt. Die Aufnahme der Emission erfolgte über einen Bereich von  $\lambda_{em} = 500\text{-}700 \text{ nm}$  (Filter: 430-1100 nm) mit 5 nm Schlitzbreite. Nach der Messung der Hintergrundfluoreszenz wurde das GST SH2-Fusionsprotein in definierten Mengen aus einer Stammlösung (GST-Src SH2: 577  $\mu\text{M}$ , Phosphat-Puffer; GST-Lck SH2: 308  $\mu\text{M}$ , MOPS-Puffer) zugegeben, um volumenkorrigierte Proteinkonzentrationen von 5, 10 und 20  $\mu\text{M}$  zu erhalten. Die Fluoreszenzspektren wurden 2 min nach Proteinzugabe mit je drei Scans aufgezeichnet, deren Mittelwert für die Auswertung verwendet wurde.

## 6.6 Versuche zur stamminernen Fluoreszenzmarkierung

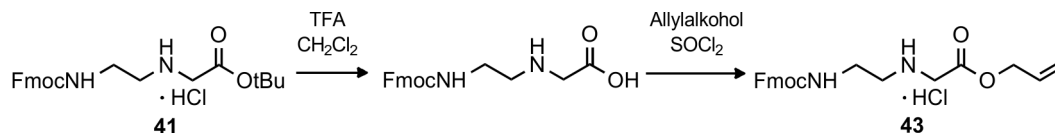
### 6.6.1 Synthese der modifizierten PNA-Monomere

#### PNA-Rückgrat (41)



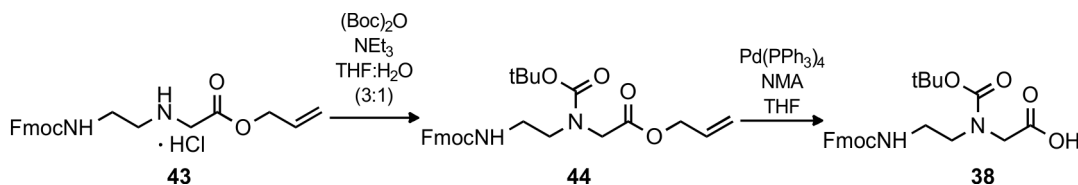
Die Synthese von Fmoc-Aeg-OtBu·HCl (**41**) erfolgte nach der literaturbekannten Methode von Thomson *et al.* mit den in der Arbeitsgruppe Seitz etablierten Optimierungen.<sup>[177]</sup> Die Ergebnisse der Analyse stimmten mit den Literaturdaten überein.

## Umschüttung des PNA-Rückgrats (43)



Die Synthese von Fmoc-Aeg-OAllyl-HCl (**43**) erfolgte nach einer literaturbekannten Methode von Seitz *et al.*<sup>[179]</sup> Die Ergebnisse der Analyse entsprachen den Literaturdaten.

## Boc-modifiziertes PNA-Monomer (38)



Zu einer Lösung von 2.0 g Fmoc-Aeg-OAllyl-HCl (**43**) (4.8 mmol, 1 Äq.) in 10 ml THF:H<sub>2</sub>O (3:1) wurde 1.5 ml Triethylamin (10.6 mmol, 2.2 Äq.) gegeben. Nach Kühlung auf 0 °C wurde 1.2 ml Di-*tert*-butyldicarbonat (5.8 mmol, 1.2 Äq.) zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 4 h gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit 1 M HCl-Lösung und abschließend mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten, wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat extrahiert. Die gesammelten, organischen Phasen wurden über wasserfreiem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, bevor das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt wurde. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit einem Cyclohexan:Ethylacetat-Gemisch unter Verwendung eines Gradienten (4:1 → 1:1) gereinigt. Für die Freisetzung der Carboxylfunktion wurden die erhaltenen 2.08 g **44** (4.3 mmol, 90 % Ausbeute) in 85 ml THF gelöst und mit 0.5 ml NMA (4.3 mmol, 1.9 Äq.) versetzt. Unter Argon-Schutzatmosphäre wurde eine Lösung von 0.3 g Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (0.22 mmol, 0.05 Äq.) in 2 ml THF zugetropft und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde eingengt, der Rückstand in 25 ml Ethylacetat aufgenommen und mehrfach mit 1 M HCl-Lösung und abschließend mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten, wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat extrahiert. Die gesammelten, organischen Phasen wurden über wasserfreiem MgSO<sub>4</sub> getrocknet, bevor das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt wurde. Der Rückstand

wurde säulenchromatographisch mit einem Gradienten von Cyclohexan:Ethylacetat (1:1) + 0.1 % *N,N*-Dimethylethylamin über Cyclohexan:Ethylacetat (1:1) zu Ethylacetat + 1 % Ameisensäure gereinigt, um 1.7 g eines farblosen, amorphen Feststoffs zu erhalten (1.2 g **38**, 2.7 mmol, 63 % Ausbeute).

Ausbeute: 57 % über 2 Stufen

$R_f$  = 0.54 (Ethylacetat + 1 % Ameisensäure)

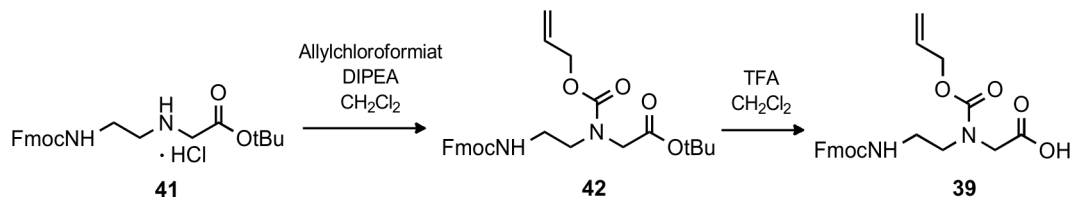
HRMS ( $m/z$ ) = 439.1876 ( $C_{24}H_{27}N_2O_6$   $[M+H]^+$ , berechnet 439.1947)

$^1H$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.31 (s, 0.2H, Fmoc-NH), 7.88 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH), 7.67 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-CH), 7.43 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-CH), 7.33 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-CH), 4.32-4.28 (m, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.19 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, Fmoc-CH), 3.84 (d,  $J$  = 10.8 Hz, 2H, -C $_{\alpha}$ H<sub>2</sub>-), 3.27-3.23 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3.14-3.11 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.37 + 1.34 (s, 9H, *t*Bu)

Die chemischen Verschiebungen bei 7.56-7.50 ppm (m, 1.6H) und 7.64-7.60 ppm (m, 2.5H) konnten der Verunreinigung Triphenylphosphan bzw. Triphenylphosphinoxid zugeordnet werden. Der Anteil der Verunreinigung betrug 28 %.

$^{13}C$ -NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ , 2 Rotamere):  $\delta$  [ppm] = 171.6 + 171.4 (quart., -COOH), 156.0 + 156.0 (quart., Fmoc-CO), 154.8 + 154.7 (quart., Boc-CO), 143.8 (quart., Fmoc), 140.6 (quart., Fmoc), 127.5 (tert., Fmoc-CH), 126.9 (tert., Fmoc-CH), 125.0 + 125.0 (tert., Fmoc-CH), 120.0 (tert., Fmoc-CH), 79.0 + 79.0 (quart., *t*Bu), 65.3 + 65.2 (sec., Fmoc-CH<sub>2</sub>), 49.2 + 48.5 (sec., -C $_{\alpha}$ H<sub>2</sub>-), 47.2 + 47.1 (sec., -CH<sub>2</sub>-), 46.7 (tert., Fmoc-CH), 38.8 + 38.6 (sec., -CH<sub>2</sub>-), 27.8 + 27.8 (prim., *t*Bu)

Die chemischen Verschiebungen bei 133.0, 132.2 ppm (quart.) und 131.9, 131.4, 131.3, 128.7, 128.6 ppm (tert.) konnten der Verunreinigung Triphenylphosphan bzw. Triphenylphosphinoxid zugeordnet werden.

Allyl-modifiziertes PNA-Monomer (39)<sup>[178]</sup>

Unter Argon-Schutzatmosphäre wurde eine Lösung von 2.0 g Fmoc-Aeg-OtBu·HCl (41) (4.6 mmol, 1.0 Äq.) in 20 ml trockenem CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mit 1.0 ml Allylchloroformiat (9.2 mmol, 2.0 Äq.) versetzt, gefolgt von der tropfenweise Zugabe von 1.6 ml DIPEA (9.2 mmol, 2.0 Äq.). Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde das Reaktionsgemisch mit 1 M HCl-Lösung und abschließend mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten, wässrigen Phasen wurden mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extrahiert. Die gesammelten, organischen Phasen wurden über wasserfreiem MgSO<sub>4</sub> getrocknet, bevor das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt wurde. Der gelbliche Rückstand wurde in 10 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und 10 ml TFA zugegeben. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung eingengt und der Rückstand mit Toluol und abschließend mit Diethylether koevaporiert. Der Feststoff wurde in 20 ml Ethylacetat gelöst und 150 ml Cyclohexan zugegeben. Die Suspension wurde 10 min gerührt, bevor das Präzipitat durch Filtration abgetrennt wurde, um einen farblosen, amorphen Feststoff in 84 % Ausbeute (1.7 g, 4.0 mmol) zu erhalten.

Ausbeute: 84 % über 2 Stufen

R<sub>f</sub> = 0.66 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH (80:20) + 1 % Ameisensäure)

HRMS (m/z) = 423.1561 (C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup>, berechnet: 423.1634)

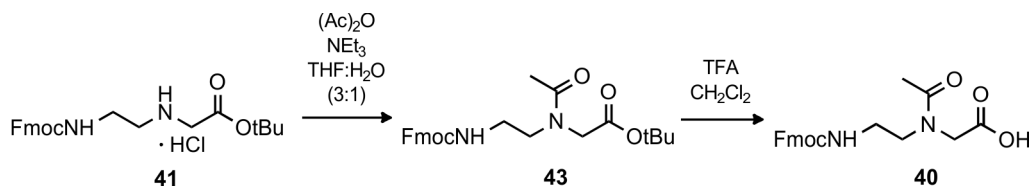
t<sub>R</sub> = 11.4 min (Agilent, 30 → 90 % B in 20 min, 260 nm)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 12.74 (s, 1H, -COOH), 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH), 7.67 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-CH), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-CH), 5.91-5.81 (m, 1H, Allyl-CH), 5.25 (t, *J* = 17.3 Hz, 1H, Allyl-CH), 5.14 (t, *J* = 10.6 Hz, 1H, Allyl-CH), 4.49 (t, *J* = 5.0 Hz, 2H, Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.29 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, Allyl-CH<sub>2</sub>), 4.22-4.20 (m, 1H, Fmoc-CH), 3.92 (d, *J* = 15.4 Hz, 2H, -C<sub>α</sub>H<sub>2</sub>-), 3.34-3.30 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3.18-3.14 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-)

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 171.0 (quart., -COOH), 156.1 (quart., Fmoc-CO), 155.4 (quart., -CO), 143.8 (quart., Fmoc), 140.6 (quart., Fmoc), 133.1 (tert., Allyl-CH), 127.5 (tert., Fmoc-CH), 127.0 (tert., Fmoc-CH), 125.0 (tert., Fmoc-CH), 120.0 (tert., Fmoc-CH), 116.3 (sec., Allyl-CH<sub>2</sub>), 65.3 (sec., Fmoc-CH<sub>2</sub>), 65.1 (sec., Allyl-CH<sub>2</sub>), 48.9 (sec., -C<sub>α</sub>H<sub>2</sub>-), 47.0 (sec., -CH<sub>2</sub>-), 46.6 (tert., Fmoc-CH), 38.4 (sec., -CH<sub>2</sub>-)



## Acetyl-modifiziertes PNA-Monomer (40)



Zu einer Lösung von 2.0 g Fmoc-Aeg-OtBu·HCl (**41**) (4.6 mmol, 1 Äq.) in 10 ml THF:H<sub>2</sub>O (3:1) wurde 1.4 ml Triethylamin (10.2 mmol, 2.2 Äq.) gegeben. Nach Kühlung auf 0 °C wurde 0.5 ml Essigsäureanhydrid (5.5 mmol, 1.2 Äq.) zugefügt. Die Reaktionsmischung wurde langsam auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 4 h gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels wurde der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen und dreimal mit 1 M HCl-Lösung und abschließend mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten, wässrigen Phasen wurden mit Ethylacetat extrahiert. Die gesammelten, organischen Phasen wurde über wasserfreiem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, bevor das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt wurde. Der gelbliche Rückstand wurde in 8 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst und 8 ml TFA zugegeben. Nach 30 min Rühren bei Raumtemperatur wurde die Lösung eingeeengt und der Rückstand mit Toluol und abschließend mit Diethylether koevaporiert. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit Ethylacetat + 1 % Ameisensäure gereinigt, um einen farblosen, amorphen Feststoff in 87 % Ausbeute (1.3 g, 3.5 mmol) zu erhalten.

Ausbeute: 87 % über 2 Stufen

R<sub>f</sub> = 0.34 (Ethylacetat + 1 % Ameisensäure)

HRMS (m/z) = 381.1456 (C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>, berechnet 381.1529)

t<sub>R</sub> = 8.5 min (Agilent, 30 → 90 % B in 20 min, 260 nm)

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 2 Rotamere): δ [ppm] = 7.88 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH), 7.67 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H, Fmoc-CH), 7.41 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-CH), 7.33 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Fmoc-CH), 4.34 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H) + 4.28 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H) (Fmoc-CH<sub>2</sub>), 4.22-4.20 (m, 1H, Fmoc-CH), 4.08 (s, 1H) + 3.91 (s, 1H) (-C<sub>α</sub>H<sub>2</sub>-), 3.37-3.30 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 3.18-3.10 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.98 (s, 2H) + 1.90 (s, 1H) (-CH<sub>3</sub>)

<sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 2 Rotamere): δ [ppm] = 171.3 + 170.8 (quart., -COOH), 170.6 + 170.0 (quart., -CO), 156.2 + 156.0 (quart., Fmoc-CO), 143.8 (quart., Fmoc), 140.7 (quart., Fmoc), 127.5 (tert., Fmoc-CH), 127.0 (tert., Fmoc-CH), 125.0 (tert., Fmoc-CH), 120.0 (tert., Fmoc-CH), 65.3 (sec., Fmoc-CH<sub>2</sub>), 50.6 + 47.0 (sec., -C<sub>α</sub>H<sub>2</sub>-), 48.3 + 46.1 (sec., -CH<sub>2</sub>-), 46.7 (tert., Fmoc-CH), 38.6 + 38.2 (sec., -CH<sub>2</sub>-), 21.6 + 20.6 (prim., -CH<sub>3</sub>)

### 6.6.2 Detektion von SH2-Proteindomänen mit *IS-HPBs*

#### **H-g-P2-S-g-PQpYEEIPI-c-Q-S-c-G-NH<sub>2</sub> (46)**

Das Produkt wurde im 2  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 0.7 OD<sub>260 nm</sub> (9 nmol, <1 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 81640 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 8.5 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3170.2 (C<sub>143</sub>H<sub>178</sub>N<sub>43</sub>O<sub>40</sub>P)  
 gefunden: 3170.0

#### **H-g-P2-g-PQpYEEIPI-c-Q-c-G-NH<sub>2</sub> (47)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 28.2 OD<sub>260 nm</sub> (346 nmol, 14 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 81640 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 8.5 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 2885.9 (C<sub>131</sub>H<sub>158</sub>N<sub>39</sub>O<sub>36</sub>P)  
 gefunden: 2885.7

#### **H-t-P2-g-PQpYEEIPI-c-Q-a-G-NH<sub>2</sub> (48)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 60.2 OD<sub>260 nm</sub> (701 nmol, 28 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 85840 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 8.2 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 2884.9 (C<sub>132</sub>H<sub>159</sub>N<sub>38</sub>O<sub>36</sub>P)  
 gefunden: 2884.7

#### **H-t-P2-t-PQpYEEIPI-a-Q-a-G-NH<sub>2</sub> (49)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 33.9 OD<sub>260 nm</sub> (377 nmol, 15 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 90040 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 9.1 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 2883.9 (C<sub>133</sub>H<sub>160</sub>N<sub>37</sub>O<sub>36</sub>P)  
 gefunden: 2883.6

**H-g-P4-g-PQpYEEIPI-c-Q-c-G-NH<sub>2</sub> (50)**

Das Produkt wurde im 2  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 3.2 OD<sub>260 nm</sub> (41 nmol, 2 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 79070 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 9.4 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 2913.9 (C<sub>133</sub>H<sub>162</sub>N<sub>39</sub>O<sub>36</sub>P)

gefunden: 2913.8

**H-t-P4-g-PQpYEEIPI-c-Q-a-G-NH<sub>2</sub> (51)**

Das Produkt wurde im 2  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 15.8 OD<sub>260 nm</sub> (190 nmol, 10 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 83270 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 10.0 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 2912.9 (C<sub>134</sub>H<sub>163</sub>N<sub>38</sub>O<sub>36</sub>P)

gefunden: 2912.6

**H-t-P4-t-PQpYEEIPI-a-Q-a-G-NH<sub>2</sub> (52)**

Das Produkt wurde im 2  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 16.1 OD<sub>260 nm</sub> (184 nmol, 9 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 87470 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 10.5 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 2912.0 (C<sub>135</sub>H<sub>164</sub>N<sub>37</sub>O<sub>36</sub>P)

gefunden: 2911.6

**H-gg-P2-g-PQpYEEIPI-c-Q-cc-G-NH<sub>2</sub> (53)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 0.4 OD<sub>260 nm</sub> (4 nmol, <1 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 99940 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 7.8 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3428.4 (C<sub>152</sub>H<sub>184</sub>N<sub>51</sub>O<sub>42</sub>P)

gefunden: 3428.3

**H-g-P2-gg-PQpYEEIPI-cc-Q-c-G-NH<sub>2</sub> (54)**

Das Produkt wurde im 5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 18.6 OD<sub>260 nm</sub> (186 nmol, 4 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 99940 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 7.6 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3428.4 (C<sub>152</sub>H<sub>184</sub>N<sub>51</sub>O<sub>42</sub>P)

gefunden: 3428.2

**H-g-P4-gg-PQpYEEIPI-cc-Q-c-G-NH<sub>2</sub> (55)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 21.4 OD<sub>260 nm</sub> (220 nmol, 9 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 97370 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 8.9 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3456.4 (C<sub>154</sub>H<sub>188</sub>N<sub>51</sub>O<sub>42</sub>P)

gefunden: 3456.2

**H-ga-P2-ag-PQpYEEIPI-ct-Q-tc-G-NH<sub>2</sub> (56)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 3.8 OD<sub>260 nm</sub> (30 nmol, 1 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 126640 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 0.80 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3968.9 (C<sub>175</sub>H<sub>212</sub>N<sub>61</sub>O<sub>48</sub>P)

gefunden: 3968.6

**H-ga-P4-ag-PQpYEEIPI-ct-Q-tc-G-NH<sub>2</sub> (57)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 2.4 OD<sub>260 nm</sub> (19 nmol, <1 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 124070 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 0.90 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3997.0 (C<sub>177</sub>H<sub>216</sub>N<sub>61</sub>O<sub>48</sub>P)

gefunden: 3996.7

**H-gg-P2-gg-PQpYEEIPI-cc-Q-cc-G-NH<sub>2</sub> (58)**

Das Produkt wurde im 5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 18.4 OD<sub>260 nm</sub> (156 nmol, 3 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 118240 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 0.78 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3970.9 (C<sub>173</sub>H<sub>210</sub>N<sub>63</sub>O<sub>48</sub>P)

gefunden: 3971.0

**H-cc-P2-cc-PQpYEEIPI-gg-Q-gg-G-NH<sub>2</sub> (59)**

Das Produkt wurde im 5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 24.0 OD<sub>260 nm</sub> (203 nmol, 8 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 118240 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.10 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3970.9 (C<sub>173</sub>H<sub>210</sub>N<sub>63</sub>O<sub>48</sub>P)

gefunden: 3970.6

**H-tg-P2-gg-PQpYEEIPI-cc-Q-ca-G-NH<sub>2</sub> (60)**

Das Produkt wurde im 5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 25.1 OD<sub>260 nm</sub> (205 nmol, 4 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 122440 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 0.77 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3969.9 (C<sub>174</sub>H<sub>211</sub>N<sub>62</sub>O<sub>48</sub>P)

gefunden: 3967.0

**H-tg-P4-gg-PQpYEEIPI-cc-Q-ca-G-NH<sub>2</sub> (61)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 7.0 OD<sub>260 nm</sub> (58 nmol, 2 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 119870 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 0.88 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3998.0 (C<sub>176</sub>H<sub>215</sub>N<sub>62</sub>O<sub>48</sub>P)

gefunden: 3997.7

**H-*cca*-P2-*ac*-PQpYEEIPI-*gt*-Q-*tgg*-G-NH<sub>2</sub> (62)**

Das Produkt wurde im 5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 35.5 OD<sub>260 nm</sub> (245 nmol, 5 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 144940 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.12 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 4511.4 (C<sub>196</sub>H<sub>238</sub>N<sub>73</sub>O<sub>54</sub>P)

gefunden: 4511.2

**H-*cca*-S-P2-S-*ac*-PQpYEEIPI-*gt*-Q-S-Q-*tgg*-G-NH<sub>2</sub> (63)**

Das Produkt wurde im 5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 20.5 OD<sub>260 nm</sub> (117 nmol, 2 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 174900 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 0.99 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 5272.2 (C<sub>233</sub>H<sub>282</sub>N<sub>81</sub>O<sub>64</sub>P)

gefunden: 5272.2

**H-*cca*-P4-*ac*-PQpYEEIPI-*gt*-Q-*tgg*-G-NH<sub>2</sub> (64)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 9.8 OD<sub>260 nm</sub> (69 nmol, 3 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 142370 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 0.94 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 4539.5 (C<sub>198</sub>H<sub>242</sub>N<sub>73</sub>O<sub>54</sub>P)

gefunden: 4539.2

**H-*acc*-P4-*ca*-PQpYEEIPI-*tg*-Q-*ggt*-G-NH<sub>2</sub> (65)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 7.5 OD<sub>260 nm</sub> (53 nmol, 2 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 142370 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 0.92 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 4539.5 (C<sub>198</sub>H<sub>242</sub>N<sub>73</sub>O<sub>54</sub>P)

gefunden: 4539.1

**H-cca-P2-S-P2-ac-PQpYEEIPI-gt-S-Q-S-tgg-G-NH<sub>2</sub> (66)**

Das Produkt wurde im 5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 26.7 OD<sub>260 nm</sub> (167 nmol, 3 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 0.93 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 5280.3 (C<sub>236</sub>H<sub>286</sub>N<sub>81</sub>O<sub>62</sub>P)

gefunden: 5280.3

**H-cca-P2-P2-ac-PQpYEEIPI-gt-Q-tgg-G-NH<sub>2</sub> (67)**

Das Produkt wurde im 5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 23.4 OD<sub>260 nm</sub> (146 nmol, 3 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.02 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 4853.8 (C<sub>218</sub>H<sub>256</sub>N<sub>75</sub>O<sub>56</sub>P)

gefunden: 4853.6

**H-ca-P2-P2-acc-PQpYEEIPI-ggt-Q-tg-G-NH<sub>2</sub> (68)**

Das Produkt wurde im 5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 12.3 OD<sub>260 nm</sub> (77 nmol, 2 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 0.93 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 4853.8 (C<sub>218</sub>H<sub>256</sub>N<sub>75</sub>O<sub>56</sub>P)

gefunden: 4853.8

**H-K(C2Pyr)-K(C2Pyr)-PQpYEEIPI-K(C1Anthr)-NH<sub>2</sub> (69)**

Das Produkt wurde im 2  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 13.7 OD<sub>260 nm</sub> (303 nmol, 15 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 45040 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.21 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 1800.0 (C<sub>91</sub>H<sub>111</sub>N<sub>14</sub>O<sub>23</sub>P)

gefunden: 1799.0

## Fluoreszenzspektroskopische Messungen

### *Messung der Hintergrundfluoreszenz*

Sämtliche Messungen wurden in entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem Phosphat-Puffer (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7.4) bei 25 °C durchgeführt. Die Stammlösungen der Sonden wurden mit einem  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ -Gemisch (1:1, v:v) zu einer 10  $\mu\text{M}$  Konzentration verdünnt, auf 80 °C erhitzt und langsam auf 25 °C abgekühlt. Anschließend wurde 150  $\mu\text{l}$  Lösung einer 1 bzw. 2  $\mu\text{M}$  Konzentration der jeweiligen Sonde in Puffer hergestellt. Die Konzentrationen wurden am UV-Spektrometer mithilfe der Absorption bei 260 nm geprüft und gegebenenfalls angepasst. Die Fluoreszenzmessungen wurden bei einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex} = 340$  nm (Filter: 250-395 nm) mit 10 nm Schlitzbreite durchgeführt. Die Aufnahme der Emission erfolgte über einen Bereich von  $\lambda_{em} = 360$ -600 nm (Filter: 360-1100 nm) mit 10 nm Schlitzbreite und drei Scans, deren Mittelwert für die Auswertung verwendet wurde.

### *Detektion von SH2-Domänen*

Sämtliche Messungen wurden in entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem Phosphat-Puffer (20 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7.4) bei 25 °C durchgeführt. Die Stammlösungen der Sonden wurden mit einem  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ -Gemisch (1:1, v:v) zu einer 10  $\mu\text{M}$  Konzentration verdünnt, auf 80 °C erhitzt und langsam auf 25 °C abgekühlt. Anschließend wurde 140  $\mu\text{l}$  Lösung einer 1  $\mu\text{M}$  Konzentration der jeweiligen Sonde in Puffer hergestellt. Die Konzentrationen wurden am UV-Spektrometer mithilfe der Absorption bei 260 nm geprüft und gegebenenfalls angepasst. Die Fluoreszenzmessungen wurden bei einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex} = 340$  nm (Filter: 250-395 nm) mit 10 nm Schlitzbreite durchgeführt. Die Aufnahme der Emission erfolgte über einen Bereich von  $\lambda_{em} = 360$ -600 nm (Filter: 360-1100 nm) mit 10 nm Schlitzbreite. Nach der Messung der Hintergrundfluoreszenz wurde das GST SH2-Fusionsprotein in definierten Mengen aus einer Stammlösung (GST-Src SH2: 577  $\mu\text{M}$ , Phosphat-Puffer; GST-Lck SH2: 308  $\mu\text{M}$ , MOPS-Puffer) zugegeben, um volumenkorrigierte Proteinkonzentrationen von 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{M}$  zu erhalten. Die Fluoreszenzspektren wurden 2 min nach Proteinzugabe mit je drei Scans aufgezeichnet, deren Mittelwert für die Auswertung verwendet wurde.



**Enzymatische Spaltung**

Sämtliche Messungen wurden in entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem Tris-CIP-Puffer (20 mM Tris-Cl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8.0 + 0.1 % (w/v) BSA) durchgeführt. Die Stammlösungen der Sonden wurden mit dem Tris-CIP-Puffer zu einer 10  $\mu\text{M}$  Konzentration verdünnt, auf 80 °C erhitzt und langsam auf 25 °C abgekühlt. Anschließend wurde 140  $\mu\text{l}$  Lösung einer 1  $\mu\text{M}$  Konzentration der jeweiligen Sonde in Puffer hergestellt. Die Konzentrationen wurden am UV-Spektrometer mithilfe der Absorption bei 260 nm geprüft und gegebenenfalls angepasst.

Die Fluoreszenzmessungen wurden bei einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex} = 340 \text{ nm}$  (Filter: 250-395 nm) mit 10 nm Schlitzbreite durchgeführt. Die Aufnahme der Emissionsspektren erfolgte über einen Bereich von  $\lambda_{em} = 360\text{-}600 \text{ nm}$  (Filter: 360-1100 nm) mit 10 nm Schlitzbreite. Nach der Messung der Hintergrundfluoreszenz bei 25 °C wurde 0.7 U CIP (6  $\mu\text{l}$  einer 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  Lösung, 120.4  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ) zugegeben und die Lösung 24 h bei 37 °C und 300 rpm in einem verschlossenen Gefäß inkubiert. Der Reaktionsstopp erfolgte durch 10-minütiges Erhitzen auf 75 °C. Anschließend wurde erneut ein Emissionsspektrum bei 25 °C mit drei Scans aufgezeichnet, deren Mittelwert für die Auswertung verwendet wurde. Das Reaktionsgemisch wurde gefriergetrocknet und in einem  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}$ -Gemisch (50 % MeCN) gelöst, um eine MALDI-MS-Analyse durchzuführen.

Die kinetischen Messungen wurden bei derselben Anregungswellenlänge und bei einer Emissionswellenlänge von  $\lambda_{em, \text{Monomer}} = 400 \text{ nm}$  bzw.  $\lambda_{em, \text{Excimer}} = 480 \text{ nm}$  bei 37 °C durchgeführt. Die Emission der 1  $\mu\text{M}$  Sondenlösung wurde vor der Zugabe von 0.7 U CIP mindestens 10 min aufgenommen und anschließend über einen Zeitraum von bis zu 24 h aufgezeichnet. Dabei wurde jede Minute ein Datenpunkt gemessen.

**6.6.3 Detektion der Matrix-Metalloprotease 7 mit *IS-HPBs*****H-cca-P2-S-P2-ac-RPLALWRS-gt-S-Q-S-tgg-G-NH<sub>2</sub> (70)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 11.7 OD<sub>260 nm</sub> (73 nmol, 3 %);  $\varepsilon_{260 \text{ nm}} = 160020 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.17 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 5210.4 ( $\text{C}_{236}\text{H}_{291}\text{N}_{87}\text{O}_{54}$ )

gefunden: 5211.0

**H-*cca*-P2-S-P2-*ac*-Ahex-RPLALWRS-Ahex-*gt*-S-Q-S-*tgg*-G-NH<sub>2</sub> (71)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 15.2 OD<sub>260 nm</sub> (95 nmol, 4 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.16 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 5436.7 (C<sub>248</sub>H<sub>313</sub>N<sub>89</sub>O<sub>56</sub>)

gefunden: 5437.3

**H-*cca*-P2-S-P2-*ac*- $\beta$ A-RPLALWRS- $\beta$ A-*gt*-S-Q-S-*tgg*-G-NH<sub>2</sub> (72)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 10.6 OD<sub>260 nm</sub> (66 nmol, 3 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.12 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 5352.5 (C<sub>242</sub>H<sub>301</sub>N<sub>89</sub>O<sub>56</sub>)

gefunden: 5353.1

**H-DDD-*cca*-P2-S-P2-*ac*-RPLALWRS-*gt*-S-Q-S-*tgg*-G-NH<sub>2</sub> (73)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 10.2 OD<sub>260 nm</sub> (64 nmol, 3 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.15 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 5555.7 (C<sub>248</sub>H<sub>306</sub>N<sub>90</sub>O<sub>63</sub>)

gefunden: 5556.1

**H-DDD-*cca*-P2-S-P2-*ac*-Ahex-RPLALWRS-Ahex-*gt*-S-Q-S-*tgg*-G-NH<sub>2</sub> (74)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 14.2 OD<sub>260 nm</sub> (89 nmol, 4 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.15 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 5782.0 (C<sub>260</sub>H<sub>328</sub>N<sub>92</sub>O<sub>65</sub>)

gefunden: 5782.5

**H-DDD-cca-P2-S-P2-ac- $\beta$ A-RPLALWRS- $\beta$ A-gt-S-Q-S-tgg-G-NH<sub>2</sub> (75)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 12.8 OD<sub>260 nm</sub> (80 nmol, 3 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.10 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 5697.8 (C<sub>254</sub>H<sub>316</sub>N<sub>92</sub>O<sub>65</sub>)

gefunden: 5698.3

**H-cca-P2-P2-ac-RPLALWRS-gt-Q-tgg-G-NH<sub>2</sub> (76)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 87.7 OD<sub>260 nm</sub> (548 nmol, 22 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.44 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 4783.9 (C<sub>218</sub>H<sub>261</sub>N<sub>81</sub>O<sub>48</sub>)

gefunden: 4784.1

**H-cca-P2-P2-ac-Ahex-RPLALWRS-Ahex-gt-Q-tgg-G-NH<sub>2</sub> (77)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 46.7 OD<sub>260 nm</sub> (292 nmol, 12 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.11 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 5010.2 (C<sub>230</sub>H<sub>283</sub>N<sub>83</sub>O<sub>50</sub>)

gefunden: 5010.6

**H-cca-P2-P2-ac- $\beta$ A-RPLALWRS- $\beta$ A-gt-Q-tgg-G-NH<sub>2</sub> (78)**

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 72.7 OD<sub>260 nm</sub> (454 nmol, 18 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.40 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 4926.1 (C<sub>224</sub>H<sub>271</sub>N<sub>83</sub>O<sub>50</sub>)

gefunden: 4926.2

### H-DDD-*cca-P2-P2-ac*-RPLALWRS-*gt-Q-tgg*-G-NH<sub>2</sub> (79)

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 7.5 OD<sub>260 nm</sub> (47 nmol, 2 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.13 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 5129.2 (C<sub>230</sub>H<sub>276</sub>N<sub>84</sub>O<sub>57</sub>)

gefunden: 5128.3

### H-DDD-*cca-P2-P2-ac*-Ahex-RPLALWRS-Ahex-*gt-Q-tgg*-G-NH<sub>2</sub> (80)

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 10.2 OD<sub>260 nm</sub> (64 nmol, 3 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.17 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 5355.5 (C<sub>242</sub>H<sub>298</sub>N<sub>86</sub>O<sub>59</sub>)

gefunden: 5355.7

### H-DDD-*cca-P2-P2-ac*- $\beta$ A-RPLALWRS- $\beta$ A-*gt-Q-tgg*-G-NH<sub>2</sub> (81)

Das Produkt wurde im 2.5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 14.1 OD<sub>260 nm</sub> (88 nmol, 4 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 160020 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.05 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 5271.3 (C<sub>236</sub>H<sub>286</sub>N<sub>86</sub>O<sub>59</sub>)

gefunden: 5271.6

### H-K(C2Pyr)-K(C2Pyr)-RPLALWRS-K(C1Anthr)-NH<sub>2</sub> (82)

Das Produkt wurde im 5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 und 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 57.5 OD<sub>260 nm</sub> (956 nmol, 19 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 60120 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 1.09 \text{ min}$  (UPLC, 10  $\rightarrow$  80 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 2100.5 (C<sub>115</sub>H<sub>138</sub>N<sub>22</sub>O<sub>17</sub>)

gefunden: 2100.4

## Fluoreszenzspektroskopische Messungen

### *Statische Fluoreszenzmessungen*

Sämtliche Messungen wurden in entgastem und anschließend mit Argon gesättigtem HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 + 0.05 % (w/v) CHAPS) und DMEM\* im 384er *Well Plate*-Format durchgeführt. Die Stammlösungen der Sonden wurden mit einem H<sub>2</sub>O:MeCN-Gemisch (1:1, v:v) zu einer 10  $\mu$ M Konzentration verdünnt, auf 80 °C erhitzt und langsam auf 25 °C abgekühlt. Die Konzentrationen wurden am Mikrovolumenphotometer mithilfe der Absorption bei 260 nm bestimmt. In jedes *Well* wurde Puffer bzw. DMEM\* vorgelegt und nach Messung der Emissionswerte, die jeweilige Sonde in einer 1  $\mu$ M Konzentration und einem Endvolumen von 50  $\mu$ l zugegeben. Nach Aufnahme der Fluoreszenzspektren bei 25 °C wurde das *Well Plate* auf 37 °C erwärmt und MMP-7 zu einer Endkonzentration von 25 nM aus einer 1:499-Verdünnung der MMP-7-Stammlösung (110  $\mu$ M, HEPES-Puffer) zugefügt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden nach diversen Zeitintervallen über einen gesamten Zeitraum von bis zu 24 h gemessen. Bei längeren Zeitabständen wurde die Platte mit Folie abgedeckt in einem Thermoschüttler bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Gleichzeitig wurde die Signalintensität der Sonden ohne Enzymzugabe, sowie der Puffer betrachtet. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Die kinetische Messung wurde unterbrochen, sobald ein Plateau der Signalintensität erreicht war. Das *Well Plate* wurde auf 25 °C abgekühlt und erneut die Fluoreszenzspektren bei 25 °C aufgezeichnet. Das Reaktionsgemisch jeder Sonde wurde vereinigt und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in einem H<sub>2</sub>O:MeCN-Gemisch (1:1, v:v) aufgenommen und mittels HPLC-MS analysiert.

### *Zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen*

Die Stammlösungen der Sonden wurden mit einem H<sub>2</sub>O:MeCN-Gemisch (1:1, v:v) zu einer 10  $\mu$ M Konzentration verdünnt, auf 80 °C erhitzt und langsam auf 25 °C abgekühlt. Die Konzentrationen wurden am Mikrovolumenphotometer mithilfe der Absorption bei 260 nm bestimmt.

Die Sonden wurden im jeweiligen Medium (HEPES-Puffer: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4 + 0.05 % (w/v) CHAPS oder DMEM\*) zu einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M verdünnt. Anschließend wurden 150  $\mu$ l Aliquote in 0.5 ml-Gefäße überführt und verschiedene MMP-7-Mengen aus einer 1:199-Verdünnung (für 25 nM Endkonzentration) bzw. 1:1999-Verdünnung (für 0.5, 0.1 nM

Endkonzentrationen) der MMP-7-Stammlösung (110  $\mu\text{M}$ , HEPES-Puffer) zugegeben. Die resultierenden Gemische wurden 24 h bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Die Abklingkurven wurden mit  $\lambda_{ex} = 280\text{ nm}$  und  $\lambda_{em} = 480\text{ nm}$  jeweils über einen Zeitraum von 5 min aufgezeichnet.

Vor den Messungen im Humanserum wurde dieses mit einem 0.25  $\mu\text{m}$  Filter sterilfiltriert. Die Messungen wurden in unverdünntem Humanserum und in verschiedenen Verdünnungen mit HEPES-Puffer (1:1, 1:10, 1:100) mit diversen Pefabloc® SC-Konzentrationen (5, 10, 15, 20 mM) durchgeführt. Die Sonden wurden im jeweiligen Gemisch zu einer Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  verdünnt und in zwei Aliquote (je 150  $\mu\text{l}$ ) aufgeteilt. Die Abklingkurven wurden mit  $\lambda_{ex} = 280\text{ nm}$  und  $\lambda_{em} = 480\text{ nm}$  jeweils über einen Zeitraum von 5 min aufgezeichnet. Anschließend wurde zu einem Aliquot MMP-7 aus einer 1:13999-Verdünnung der MMP-7-Stammlösung (110  $\mu\text{M}$ , HEPES-Puffer) zu einer 1 nM Endkonzentration im Humanserum zugegeben. Die Probe ohne MMP-7-Zusatz fungierte als Blindprobe. Beide Proben wurden 24 h bei 37°C und 300 rpm inkubiert und anschließend die Abklingkurven erneut aufgenommen. Die Messung mit dem 1:10-Gemisch wurden dreimal durchgeführt und der Mittelwert mit Standardabweichung gebildet.

## 6.7 Versuche zur thermodynamischen Untersuchung der PNA-Peptid-Konjugate

Die Festphasensynthesen wurden unter Verwendung eines Rinkamid-Harzes (Beladungsgrad: 190  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) durchgeführt. Dieses wurde mit Fmoc-Glycin-OH vorbeladen. Die Ansatzgröße wurde anhand der Beladung berechnet, die die erstmalige Fmoc-Abspaltung ergab.

### **H-K-*tttg*-PQpYEEIPI-*caaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (13)**

Das Produkt wurde im 22.6  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 synthetisiert.

Ausbeute: 400.7 OD<sub>260 nm</sub> (4.7  $\mu\text{mol}$ , 21 %);  $\varepsilon_{260\text{ nm}} = 85800\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 13.1\text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  50 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z):	berechnet:	3547.6 (C <sub>147</sub> H <sub>205</sub> N <sub>60</sub> O <sub>44</sub> P)
	gefunden:	3547.2

**H-K-gttg-PQpYEEIPI-caac-K-G-NH<sub>2</sub> (14)**

Das Produkt wurde im 29.2  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 synthetisiert.

Ausbeute: 607.9 OD<sub>260 nm</sub> (7.5  $\mu\text{mol}$ , 26 %);  $\varepsilon_{260\text{ nm}} = 81600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 12.9\text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  50 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3548.5 (C<sub>146</sub>H<sub>204</sub>N<sub>61</sub>O<sub>44</sub>P)

gefunden: 3548.2

**H-D-K-gttg-PQpYEEIPI-caac-K-G-NH<sub>2</sub> (15)**

Das Produkt wurde im 2  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 13.9 OD<sub>260 nm</sub> (170 nmol, 9 %);  $\varepsilon_{260\text{ nm}} = 81600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 10.5\text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  70 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3663.6 (C<sub>150</sub>H<sub>209</sub>N<sub>62</sub>O<sub>47</sub>P)

gefunden: 3663.2

**H-DD-K-gttg-PQpYEEIPI-caac-K-G-NH<sub>2</sub> (16)**

Das Produkt wurde im 25  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 222.8 OD<sub>260 nm</sub> (2.7  $\mu\text{mol}$ , 11 %);  $\varepsilon_{260\text{ nm}} = 81600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 10.5\text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  70 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3778.7 (C<sub>154</sub>H<sub>214</sub>N<sub>63</sub>O<sub>50</sub>P)

gefunden: 3778.2

**H-DDD-K-gttg-PQpYEEIPI-caac-K-G-NH<sub>2</sub> (17)**

Das Produkt wurde im 2x2  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 30.8 OD<sub>260 nm</sub> (378 nmol, 10 %);  $\varepsilon_{260\text{ nm}} = 81600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 10.5\text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  70 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3893.8 (C<sub>158</sub>H<sub>219</sub>N<sub>64</sub>O<sub>53</sub>P)

gefunden: 3893.3

### **H-DD-K-*tttg*-PQpYEEIPI-*caaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (18)**

Das Produkt wurde im 25  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 299.4 OD<sub>260 nm</sub> (3.5  $\mu\text{mol}$ , 14 %);  $\varepsilon_{260\text{ nm}} = 85800\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 10.4\text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  70 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3777.7 (C<sub>155</sub>H<sub>215</sub>N<sub>62</sub>O<sub>50</sub>P)

gefunden: 3776.3

### **H-DDD-K-*tttg*-PQpYEEIPI-*caaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (19)**

Das Produkt wurde im 2x2  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 47.2 OD<sub>260 nm</sub> (550 nmol, 14 %);  $\varepsilon_{260\text{ nm}} = 85800\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 10.4\text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  70 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3892.8 (C<sub>159</sub>H<sub>220</sub>N<sub>63</sub>O<sub>53</sub>P)

gefunden: 3893.0

### **H-K-*gcta*-PQpYEEIPI-*ccaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (20)**

Das Produkt wurde im 37.6  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 synthetisiert.

Ausbeute: 748.9 OD<sub>260 nm</sub> (9.2  $\mu\text{mol}$ , 25 %);  $\varepsilon_{260\text{ nm}} = 81400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 10.6\text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  70 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3517.5 (C<sub>145</sub>H<sub>203</sub>N<sub>62</sub>O<sub>42</sub>P)

gefunden: 3517.6

### **H-DD-K-*gcta*-PQpYEEIPI-*ccaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (21)**

Das Produkt wurde im 25  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 226.3 OD<sub>260 nm</sub> (2.8  $\mu\text{mol}$ , 11 %);  $\varepsilon_{260\text{ nm}} = 81400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 10.5\text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  70 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3747.7 (C<sub>153</sub>H<sub>213</sub>N<sub>64</sub>O<sub>48</sub>P)

gefunden: 3746.5



**H-DDD-K-*gcta*-PQpYEEIPI-*ccaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (22)**

Das Produkt wurde im 2x 2  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 59.7 OD<sub>260 nm</sub> (734 nmol, 18 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 81400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 10.5 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  70 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3862.8 (C<sub>157</sub>H<sub>218</sub>N<sub>65</sub>O<sub>51</sub>P)

gefunden: 3862.7

**H-DD-K-*gttg*-TEGQpYQPQP-*caac*-K-G-NH<sub>2</sub> (23)**

Das Produkt wurde im 5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 63.6 OD<sub>260 nm</sub> (779 nmol, 16 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 81600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 9.2 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  70 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3837.7 (C<sub>153</sub>H<sub>211</sub>N<sub>66</sub>O<sub>52</sub>P)

gefunden: 3837.7

**H-DD-K-*tttg*-TEGQpYQPQP-*caaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (24)**

Das Produkt wurde im 5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 104.7 OD<sub>260 nm</sub> (1.2  $\mu$ mol, 24 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 85800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 10.1 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  50 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3836.7 (C<sub>154</sub>H<sub>212</sub>N<sub>65</sub>O<sub>52</sub>P)

gefunden: 3836.6

**H-DD-K-*gcta*-TEGQpYQPQP-*ccaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (25)**

Das Produkt wurde im 5  $\mu$ mol-Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 41.3 OD<sub>260 nm</sub> (507 nmol, 10 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 81400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 9.3 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  50 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 3806.7 (C<sub>152</sub>H<sub>210</sub>N<sub>67</sub>O<sub>50</sub>P)

gefunden: 3806.7

### **H-DD-K-*gttg*-PQpYEEIPI-K-G-NH<sub>2</sub> (26)**

Das Produkt wurde im 3x2  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 46.3 OD<sub>260 nm</sub> (1.1  $\mu\text{mol}$ , 19 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 41000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 11.2 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  70 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 2725.7 (C<sub>112</sub>H<sub>162</sub>N<sub>39</sub>O<sub>40</sub>P)

gefunden: 2725.4

### **H-DD-K-*tttg*-PQpYEEIPI-K-G-NH<sub>2</sub> (27)**

Das Produkt wurde im 3x2  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 67.4 OD<sub>260 nm</sub> (1.8  $\mu\text{mol}$ , 30 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 38100 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 11.1 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  70 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 2700.7 (C<sub>112</sub>H<sub>163</sub>N<sub>36</sub>O<sub>41</sub>P)

gefunden: 2700.4

### **H-DD-K-*gcta*-PQpYEEIPI-K-G-NH<sub>2</sub> (28)**

Das Produkt wurde im 3x2  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 53.4 OD<sub>260 nm</sub> (1.3  $\mu\text{mol}$ , 22 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 40800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 11.9 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  50 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 2694.7 (C<sub>111</sub>H<sub>161</sub>N<sub>40</sub>O<sub>38</sub>P)

gefunden: 2694.5

### **H-DD-K-PQpYEEIPI-*caac*-K-G-NH<sub>2</sub> (29)**

Das Produkt wurde im 3x2  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 43.4 OD<sub>260 nm</sub> (1.1  $\mu\text{mol}$ , 18 %);  $\varepsilon_{260 nm} = 40600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 11.9 \text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  50 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 2663.7 (C<sub>110</sub>H<sub>160</sub>N<sub>41</sub>O<sub>36</sub>P)

gefunden: 2663.5

**H-DD-K-PQpYEEIPI-*caaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (30)**

Das Produkt wurde im 3x 2  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 48.7 OD<sub>260 nm</sub> (1.0  $\mu\text{mol}$ , 17 %);  $\varepsilon_{260\text{ nm}} = 47700\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 11.9\text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  50 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 2687.7 (C<sub>111</sub>H<sub>160</sub>N<sub>43</sub>O<sub>35</sub>P)

gefunden: 2687.6

**H-DD-K-PQpYEEIPI-*ccaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (31)**

Das Produkt wurde im 3x 2  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 30.5 OD<sub>260 nm</sub> (750 nmol, 13 %);  $\varepsilon_{260\text{ nm}} = 40600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 11.7\text{ min}$  (Merck Hitachi, 3  $\rightarrow$  50 % in 20 min, 260 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 2663.7 (C<sub>110</sub>H<sub>160</sub>N<sub>41</sub>O<sub>36</sub>P)

gefunden: 2663.7

**Ac-PQpYEEIPI-NH<sub>2</sub> (32)**

Das Produkt wurde im 20.0  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.2 synthetisiert.

Ausbeute: 60.2 OD<sub>214 nm</sub> (3.8  $\mu\text{mol}$ , 19 %);  $\varepsilon_{214\text{ nm}} = 15852\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 13.0\text{ min}$  (Agilent, 3  $\rightarrow$  50 % in 20 min, 210 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 1109.1 (C<sub>48</sub>H<sub>73</sub>N<sub>10</sub>O<sub>18</sub>P)

gefunden: 1108.5

**Ac-TEGQpYQPQP-NH<sub>2</sub> (33)**

Das Produkt wurde im 2x 5  $\mu\text{mol}$ -Maßstab nach der allgemeinen Vorschrift in Kapitel 6.2.3 synthetisiert.

Ausbeute: 41.5 OD<sub>214 nm</sub> (2.1  $\mu\text{mol}$ , 21 %);  $\varepsilon_{214\text{ nm}} = 19598\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

HPLC:  $t_R = 6.4\text{ min}$  (Agilent, 3  $\rightarrow$  30 % in 20 min, 210 nm)

ESI-MS (m/z): berechnet: 1168.1 (C<sub>47</sub>H<sub>70</sub>N<sub>13</sub>O<sub>20</sub>P)

gefunden: 1167.9

## ITC-Messungen

Die verwendeten VP ITC-Geräte waren von der Firma *MicroCal* (jetzt: *GE Healthcare*) und besaßen eine 1.45 ml große Probenzelle und eine 300  $\mu\text{l}$  große, rotierende Injektionseinheit. Die Zellbeschichtung bestand aus Hastelloy<sup>®</sup> C-276, einer extrem korrosionsbeständigen Nickel-Chrom-Molybdän-Wolfram-Legierung. Das ITC 200-Gerät der Firma *MicroCal* (jetzt: *GE Healthcare*) war mit einer 200  $\mu\text{l}$  großen Probenzelle und einer 40  $\mu\text{l}$  großen Injektionseinheit ausgestattet. Die Versuchsparameter der verschiedenen ITC-Experimente sind in Tabelle 6.3 angegeben.

**Tabelle 6.3:** Verwendete Parameter der verschiedenen ITC-Experimente.

	VP ITC (FMP)		ITC 200 (FMP)	VP ITC (HU)
Titrand	Protein	Konjugat	Protein	Konjugat
Titritator	Konjugat	Protein	Konjugat	Protein
Referenzleistung [ $\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	18	18	9	18
Rührgeschwindigkeit [rpm]	307	307	1000	300
Injektionsvolumen [ $\mu\text{l}$ ]	10	10	1	10
$V_{1. \text{Injektion}}$ [ $\mu\text{l}$ ]	5	5	0.5	5
<i>spacing time</i> [min]	30	5-10	5	3-7

*Initial Delay:* 120 s, *Feedback Mode:* hoch, *Equilibration mode:* schnell, *Filterperiod:* 2 s.

Die Lösungen der Proteindomäne und Konjugate wurden vor jeder ITC-Messung mit einem ThermoVac-Gerät von *MicroCal* 5 min entgast und dabei gleichzeitig auf eine um 5 K kleinere Temperatur als die Messtemperatur temperiert. Die Sonden wurden mit dem Dialysepuffer des jeweiligen Proteins verdünnt, wodurch eine identische Pufferzusammensetzung gewährleistet wurde. Um die luftblasenfreie Befüllung zu erleichtern, wurde für die Probenzelle ein Zusatzvolumen von 30 % und bei der Spritzeneinheit ein Zusatzvolumen von 50 % verwendet. Die erste Injektion war mit einem kleineren Volumen von 5  $\mu\text{l}$  bzw. 0.5  $\mu\text{l}$  (ITC 200), um zum einen Luftblasen in der Spritzeneinheit zu entfernen und zum anderen eine Durchmischung durch Diffusion der Zellkomponente in die Spritzeneinheit während der Äquilibrationsphase zu reduzieren. Der entsprechende Wert wurde in die Auswertung nicht miteinbezogen. Die Befüllung der Zelle, sowie der Waschvorgang, erfolgte mit einer 2.5 ml-Hamilton-Spritze. Die Zelle wurde intensiv nach jeder Messung mit Wasser gespült und zusätzlich 15 min mit 5-prozentiger SDS-Lösung nach jeder Messung mit Proteinzusatz behandelt. Des Weiteren wurde nach jedem Lauf mit einer Proteindomäne ein Wasserlauf zur Kontrolle durchgeführt, wobei Wasser zu Wasser titriert

wurde (30 x 10 Injektionen, 150 s *spacing time*), um etwaige Systemverunreinigungen zu identifizieren und gegebenenfalls zu beseitigen.

Für jedes Konjugat sowie für die Proteindomänen wurden die Verdünnungswärmen in einem zusätzlichen Experiment bestimmt. Dabei wurde eine Bindungskomponente gegen Puffer ausgetauscht. Die erhaltenen Werte ( $\Delta q_{Konjugat}$ ,  $\Delta q_{Protein}$ ) wurden von der gemessenen Wärme des Bindungsprozesses ( $\Delta q_{app}$ ) abgezogen, um die tatsächliche Bindungswärme ( $\Delta q_{Bindung}$ ) zu erhalten (Gleichung 6.3).

$$\begin{aligned}\Delta q_{Bindung} &= \Delta q_{app} - \Delta q_{Protein} - \Delta q_{Konjugat} - \Delta q_{System} \\ &= \Delta q_{app} - \Delta q_{Protein} - \Delta q_{Konjugat} \quad (\Delta q_{System} \approx 0)\end{aligned}\tag{6.3}$$

Der Wert von  $\Delta q_{System}$ , der u. a. durch die rotierende Injektionseinheit erzeugt wird, konnte durch die Titration von Wasser zu Wasser bestimmt werden und war bei dem verwendeten Geräten vernachlässigbar klein ( $\Delta q_{System} \approx 0$ ). Unter Einbeziehung des molaren Verhältnisses erhält man daraus die Bindungsenthalpie  $\Delta H_{Bindung}$ .

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der von *MicroCal* bereitgestellten Software Origin 7.0, die das Zusatzpaket für ITC enthält. Diese Software erlaubte die Integration des Injektionsprofils und die Berechnung der resultierenden Bindungsisotherme. Der Fit der Bindungsisotherme erfolgte nach dem Modell für eine Bindungsstelle und lieferte direkt den  $\Delta H$ -Wert und  $K_B$ -Wert, aus denen sich die fehlenden Parameter nach der Gibbs-Helmholtz-Gleichung (Gleichung 6.4) berechnen ließen.

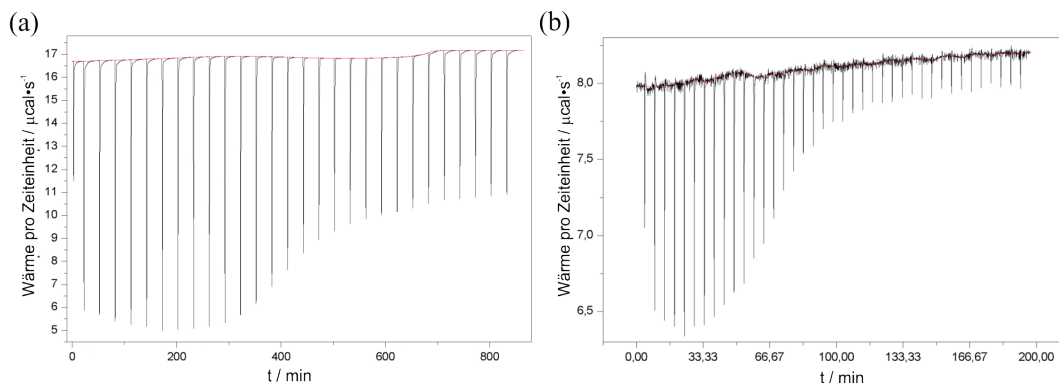
$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S = -R \cdot T \cdot \ln K_B\tag{6.4}$$

### Messungen mit dem VP ITC-Gerät am FMP

Erste ITC-Messungen wurden an einem VP ITC-Gerät mit den Parametern in Tabelle 6.3 unter Aufsicht von Nadin Jahnke (Arbeitsgruppe Prof. Keller, FMP) in Berlin-Buch durchgeführt. Als Testsystem wurde die Fusionsproteindomäne GST-Src SH2 und das Konjugat **16**, das bei der Messtemperatur von 25 °C quantitativ als Haarnadelstruktur vorliegt, verwendet. Die Proteindomäne ( $c_{SrcSH2} = 0.193$  mM, HEPES-Puffer) wurde in der Probenzelle vorgelegt und das Konjugat **16** ( $c_{16} = 2.20$  mM) in Aliquoten zutitriert (Abbildung 6.2 a). Die freiwerdenden Wärmetönungen waren so groß, dass eine *spacing time*, d. h. der zeitliche Abstand zweier aufeinanderfolgender Injektionen, von 30 min erforderlich war bis das Signal wieder der Basislinie entsprach. Die Umkehrung der experimentellen Konfiguration, d. h. der Titration des Proteins zu einer Konjugatverdünnung, konnte die *spacing time* erheblich verkürzen und den Materialverbrauch reduzieren.

### Messungen mit dem ITC 200-Gerät am FMP

Weitere Untersuchungen wurden an einem ITC 200-Gerät unter Verwendung der Parameter in Tabelle 6.3 unter Aufsicht von Nadin Jahnke (Arbeitsgruppe Prof. Keller, FMP) in Berlin-Buch durchgeführt. Als Testsystem wurde die Fusionsproteindomäne GST-Src SH2 und das Konjugat **16**, das bei der Messtemperatur von 25 °C quantitativ als Haarnadelstruktur vorliegt, verwendet. Die Proteindomäne ( $c_{\text{SrcSH2}} = 0.193 \text{ mM}$ , HEPES-Puffer) wurde in der Probenzelle vorgelegt und das Konjugat **16** ( $c_{\text{16}} = 2.20 \text{ mM}$ ) in Aliquoten zutitriert (Abbildung 6.2 b). Das Injektionsprofil wies eine starke Fluktuation der Basislinie auf, wodurch ein großer Fehler bei der Integration der Injektionssignale entsteht. Des Weiteren war eine Präzipitation der Zelllösung im Laufe der Titration zu beobachten, was dieses Gerät für weitere Messungen als ungeeignet kennzeichnete.



**Abbildung 6.2:** Erste ITC-Experimente mit GST-Src SH2. Injektionsprofil der Titration von **16** (2.20 mM) in GST-Src SH2 (193 µM) mit (a) VP ITC, 30 x 10 µl Injektionen, 307 rpm, *spacing time*: 30 min und (b) ITC 200, 40 x 1 µl Injektionen, 1000 rpm, *spacing time*: 5 min. Bedingungen: HEPES-Puffer, 25 °C.

### Messungen mit dem VP ITC-Gerät der HU

Sämtliche ITC-Experimente mit der Src SH2-Domäne, die am FMP durchgeführt wurden, wurden an einem VP ITC-Gerät unter Verwendung der Parameter in Tabelle 6.3 unter Betreuung von Dr. Hennig (Arbeitsgruppe Prof. Ernsting, HU) wiederholt. Dieses Gerät zeichnete sich durch eine geringe Fluktuation der Basislinie und eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Wärmeänderungen aus und resultierte in veränderten thermodynamischen Werten für die Bindungsprozesse. Des Weiteren wurde der Bindungsprozess an die Lck SH2-Domäne untersucht. Es wurde jeweils eine Verdünnung des PNA-Peptid-Konjugats ( $c_{\text{Konjugat}} = 30 \text{ µM}$ ) in der Zelle vorgelegt und die Proteindomäne ( $c_{\text{SH2-Domäne}} = 300 \text{ µM}$ ) zutitriert. Jede Sonde wurde, mit Ausnahme der Sonde **18**, einmal gemessen.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] F. Vitzthum, F. Behrens, N.L. Anderson, and J.H. Shaw. Proteomics: From Basic Research to Diagnostic Application. A Review of Requirements & Needs. *J. Proteome Res.*, 4(4):1086–1097, 2005.
- [2] S.J. Bark and V. Hook. The future of proteomic analysis in biological systems and molecular medicine. *Mol. BioSyst.*, 3(1):14–17, 2007.
- [3] N. Rifai, M.A. Gillette, and S.A. Carr. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotech.*, 24(8):971–983, 2006.
- [4] R. Schiess, B. Wollscheid, and R. Aebersold. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Mol. Oncol.*, 3(1):33–44, 2009.
- [5] A.V.G. Edwards, M.Y. White, and S.J. Cordwell. The Role of Proteomics in Clinical Cardiovascular Biomarker Discovery. *Mol. Cell. Proteomics*, 7(10):1824–1837, 2008.
- [6] P.R. Srinivas, B.S. Kramer, and S. Srivastava. Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet Oncol.*, 2(11):698–704, 2001.
- [7] P. Álvarez Chaver, A.M. Rodríguez-Piñeiro, F.J. Rodríguez-Berrocal, V.S. Martínez-Zorzano, and M. Páez de la Cadena. Identification of hydrophobic proteins as biomarker candidates for colorectal cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39(3):529–540, 2007.
- [8] A. Zamò and D. Cecconi. Proteomic analysis of lymphoid and haematopoietic neoplasms: There’s more than biomarker discovery. *J. Proteomics*, 73(3):508–520, 2010.
- [9] A. Taguchi and S.M. Hanash. Unleashing the Power of Proteomics to Develop Blood-Based Cancer Markers. *Clin. Chem.*, 59(1):119–126, 2013.
- [10] H. Tammen, H.-D. Zucht, and P. Budde. Oncopeptidomics – A commentary on opportunities and limitations. *Cancer Letters*, 249(1):80–86, 2007.
- [11] T.Y.K. Lau, D.P. O’Connor, D.J. Brennan, M.J. Duffy, S.R. Pennington, and W.M. Gallagher. Breast cancer proteomics: clinical perspectives. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 7(2):209–219, 2007.
- [12] S. Lista, F. Faltraco, D. Prvulovic, and H. Hampel. Blood and plasma-based proteomic biomarker research in Alzheimer’s disease. *Prog. Neurobiol.*, 101–102:1–17, 2013.
- [13] A.M. Hawkrigde and D.C. Muddiman. Mass Spectrometry-Based Biomarker Discovery: Toward a Global Proteome Index of Individuality. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2(1):265–277, 2009.
- [14] M. Palmblad, A. Tiss, and R. Cramer. Mass spectrometry in clinical proteomics – from the present to the future. *Proteomics Clin. Appl.*, 3(1):6–17, 2009.
- [15] A. Villar-Garea, M. Griese, and A. Imhof. Biomarker discovery from body fluids using mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 849(1–2):105–114, 2007.

- [16] X. Fan, I.M. White, S.I. Shopova, H. Zhu, J.D. Suter, and Y. Sun. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review. *Anal. Chim. Acta*, 620(1-2):8–26, 2008.
- [17] D. Erickson, S. Mandal, Al.H.J. Yang, and B. Cordovez. Nanobiosensors: optofluidic, electrical and mechanical approaches to biomolecular detection at the nanoscale. *Microfluid. Nanofluid.*, 4(1-2):33–52, 2008.
- [18] F. Wei, P. Patel, W. Liao, K. Chaudhry, L. Zhang, M. Arellano-Garcia, S. Hu, D. Elashoff, H. Zhou, S. Shukla, F. Shah, C.-M. Ho, and D.T. Wong. Electrochemical Sensor for Multiplex Biomarkers Detection. *Clin. Cancer Res.*, 15(13):4446–4452, 2009.
- [19] C.A.W. Sullivan and G.G. Chung. Biomarker Validation: In Situ Analysis of Protein Expression Using Semiquantitative Immunohistochemistry-Based Techniques. *Clin. Colorectal Cancer*, 7(3):172–177, 2008.
- [20] V. Gubala, R. Klein, D.M. Templeton, and M. Schwenk. Immunodiagnostics and immunosensor design (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 86(10):1539–1571, 2014.
- [21] R.C. Zangar, D.S. Daly, and A.M. White. ELISA microarray technology as a high-throughput system for cancer biomarker validation. *Expert Rev. Proteomics*, 3(1):37–44, 2006.
- [22] C.M. Loch, A.B. Ramirez, Y. Liu, C.L. Sather, J.J. Delrow, N. Scholler, B.M. Garvik, N.D. Urban, M.W. McIntosh, and P.D. Lampe. Use of high density antibody arrays to validate and discover cancer serum biomarkers. *Mol. Oncol.*, 1(3):313–320, 2007.
- [23] S. Thurley, L. Röglin, and O. Seitz. Hairpin Peptide Beacon: Dual-Labeled PNA-Peptide-Hybrids for Protein Detection. *J. Am. Chem. Soc.*, 129(42):12693–12695, 2007.
- [24] C.J. Yang, H. Lin, and W. Tan. Molecular Assembly of Superquenchers in Signaling Molecular Interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(37):12772–12773, 2005.
- [25] Y.-W. Lin, H.-T. Ho, C.-C. Huang, and H.-T. Chang. Fluorescence detection of single nucleotide polymorphisms using a universal molecular beacon. *Nucl. Acids Res.*, 36(19):e123, 2008.
- [26] A. Tsourkas, M.A. Behlke, Y. Xu, and G. Bao. Spectroscopic Features of Dual Fluorescence/Luminescence Resonance Energy-Transfer Molecular Beacons. *Anal. Chem.*, 75(15):3697–3703, 2003.
- [27] T. Pawson, G.D. Gish, and P. Nash. SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol.*, 11(12):504–511, 2001.
- [28] B.A. Liu, K. Jablonowski, M. Raina, M. Arcé, T. Pawson, and P.D. Nash. The Human and Mouse Complement of SH2 Domain Proteins-Establishing the Boundaries of Phosphotyrosine Signaling. *Mol. Cell*, 22(6):851–868, 2006.
- [29] B.A. Liu, B.W. Engelmann, and P.D. Nash. The language of SH2 domain interactions defines phosphotyrosine-mediated signal transduction. *FEBS Letters*, 586(17):2597–2605, 2012.
- [30] Z. Songyang, S.E. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W.G. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnoffsky, R.J. Lechleider, B.G. Neel, R.B. Birge, J.E. Fajardo, M.M. Chou, H. Hanafusa, B. Schaffhausen, and L.C. Cantley. SH2 Domains Recognize Specific Phosphopeptide Sequences. *Cell*, 72(4):767–776, 1993.



- [31] Z. Songyang and L.C. Cantley. Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biochem. Sci.*, 20(11):470–475, 1995.
- [32] H. Huang, L. Li, C. Wu, D. Schibli, K. Colwill, S. Ma, C. Li, P. Roy, K. Ho, Z. Songyang, T. Pawson, Y. Gao, and S.S.-C. Li. Defining the Specificity Space of the Human Src Homology 2 Domain. *Mol. Cell. Proteomics*, 7(4):768–784, 2008.
- [33] D.B. Straus, A.C. Chan, B. Patai, and A. Weiss. SH2 Domain Function Is Essential for the Role of the Lck Tyrosine Kinase in T Cell Receptor Signal Transduction. *J. Biol. Chem.*, 271(17):9976–9981, 1996.
- [34] K. Nika, L. Tautz, Y. Arimura, T. Vang, S. Williams, and T. Mustelin. A Weak Lck Tail Bite Is Necessary for Lck Function in T Cell Antigen Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.*, 282(49):36000–36009, 2007.
- [35] L.N. Ventimiglia and M.A. Alonso. The role of membrane rafts in Lck transport, regulation and signalling in T-cells. *Biochem. J.*, 454(2):169–179, 2013.
- [36] F.D. Goldman, Z.K. Ballas, B.C. Schutte, J. Kemp, C. Hollenback, N. Noraz, and N. Taylor. Defective expression of p56lck in an infant with severe combined immunodeficiency. *J. Clin. Invest.*, 102(2):421–429, 1998.
- [37] R.B. Irby, W. Mao, D. Coppola, J. Kang, J.M. Loubeau, W. Trudeau, R. Karl, D.J. Fujita, R. Jove, and T.J. Yeatman. Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat. Genet.*, 21(2):187–190, 1999.
- [38] T.K. Sawyer. Src Homology-2 Domains: Structure, Mechanisms, and Drug Discovery. *Biopolymers (Peptide Science)*, 47(3):243–261, 1998.
- [39] K. Machida and B.J. Mayer. The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochim. Biophys. Acta*, 1747(1):1–25, 2005.
- [40] M.M. Kasembeli, X. Xu, and D.J. Tweardy. SH2 domain binding to phosphopeptide ligands: potential for drug targeting. *Front. Biosci.*, 14:1010–1022, 2009.
- [41] K.B. Bibbins, H. Boeuf, and H.E. Varmus. Binding of the Src SH2 domain to phosphopeptides is determined by residues in both the SH2 domain and the phosphopeptides. *Mol. Cell. Biol.*, 13(12):7278–7287, 1993.
- [42] J.M. Bradshaw, V. Mitaxov, and G. Waksman. Mutational Investigation of the Specificity Determining Region of the Src SH2 Domain. *J. Mol. Biol.*, 299(2):521–535, 2000.
- [43] G. Waksman, S.E. Shoelson, N. Pant, D. Cowburn, and J. Kuriyan. Binding of a high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: Crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell*, 72(5):779–790, 1993.
- [44] J.M. Bradshaw, V. Mitaxov, and G. Waksman. Investigation of Phosphotyrosine Recognition by the SH2 Domain of the Src Kinase. *J. Mol. Biol.*, 293(4):971–985, 1999.
- [45] M.D. Sternlicht and Z. Werb. How Matrix Metalloproteinase Regulate Cell Behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17(1):463–516, 2001.
- [46] J.F. Woessner. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.*, 5(8):2145–2154, 1991.
- [47] H. Nagase and J.F. Woessner. Matrix Metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, 274(31):21491–21494, 1999.

- [48] G. Murphy and H. Nagase. Localizing matrix metalloproteinase activities in the pericellular environment. *FEBS J.*, 278(1):2–15, 2011.
- [49] W. Bode, C. Fernandez-Catalan, H. Tschesche, F. Grams, H. Nagase, and K. Maskos. Structural properties of matrix metalloproteinases. *Cell. Mol. Life Sci.*, 55(4):639–652, 1999.
- [50] N. Borkakoti. Matrix metalloproteases: variations on a theme. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 70(1):73–94, 1998.
- [51] H. Nagase, R. Visse, and G. Murphy. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.*, 69(3):562–573, 2006.
- [52] M.F. Leeman, S. Curran, and G.I. Murray. New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J. Pathol.*, 201(4):528–534, 2003.
- [53] T. Rath, M. Roderfeld, J. Graf, S. Wagner, A.-K. Vehr, C. Dietrich, A. Geier, and E. Roeb. Enhanced expression of MMP-7 and MMP-13 in inflammatory bowel disease: A pre-cancerous potential? *Inflamm. Bowel Dis.*, 12(11):1025–1035, 2006.
- [54] J. Maurel, C. Nadal, X. Garcia-Albeniz, R. Gallego, E. Carcereny, V. Almendro, M. Mármol, E. Gallardo, J. Maria Augé, R. Longarón, A. Martínez-Fernandez, R. Molina, A. Castells, and P. Gascón. Serum matrix metalloproteinase 7 levels identifies poor prognosis advanced colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer*, 121(5):1066–1071, 2007.
- [55] T. Masaki, H. Matsuoka, M. Sugiyama, N. Abe, A. Goto, A. Sakamoto, and Y. Atomi. Matrilysin (MMP-7) as a significant determinant of malignant potential of early invasive colorectal carcinomas. *Br. J. Cancer*, 84(10):1317–1321, 2001.
- [56] Z.-S. Wu, Q. Wu, J.-H. Yang, H.-Q. Wang, X.-D. Ding, F. Yang, and X.-C. Xu. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 122(9):2050–2056, 2008.
- [57] G. La Rocca, I. Pucci-Minafra, A. Marrazzo, P. Taormina, and S. Minafra. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *Br. J. Cancer*, 90(7):1414–1421, 2004.
- [58] J.M. Pellikainen, K.M. Ropponen, V.V. Kataja, J.K. Kellokoski, M.J. Eskelinen, and V.-M. Kosma. Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in Breast Cancer with a Special Reference to Activator Protein-2, HER2, and Prognosis. *Clin. Cancer Res.*, 10(22):7621–7628, 2004.
- [59] A. O’Grady, C. Dunne, P. O’Kelly, G.M. Murphy, M. Leader, and E. Kay. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression. *Histopathology*, 51(6):793–804, 2007.
- [60] A. Vaisanen, H. Tuominen, M. Kallioinen, and T. Turpeenniemi-hujanen. Matrix metalloproteinase-2 (72 kD type IV collagenase) expression occurs in the early stage of human melanocytic tumour progression and may have prognostic value. *J. Pathol.*, 3(180):283–289, 1996.
- [61] M.E. Stearns and M. Wang. Type IV Collagenase (MW 72,000) Expression in Human Prostate: Benign and Malignant Tissue. *Cancer Res.*, 53(4):878–883, 1993.

- [62] J.D. Knox, C. Wolf, K. McDaniel, V. Clark, M. Lorient, G.T. Bowden, and R.B. Nagle. Matrilysin expression in human prostate carcinoma. *Mol. Carcinogen.*, 15(1):57–63, 1996.
- [63] L.E. Littlepage, M.D. Sternlicht, N. Rougier, J. Phillips, E. Gallo, Y. Yu, K. Williams, A. Brenot, J.I. Gordon, and Z. Werb. Matrix Metalloproteinases Contribute Distinct Roles in Neuroendocrine Prostate Carcinogenesis, Metastasis, and Angiogenesis Progression. *Cancer Res.*, 70(6):2224–2234, 2010.
- [64] D. Trudel, Y. Fradet, F. Meyer, F. Harel, and B. Têtu. Significance of MMP-2 Expression in Prostate Cancer: an Immunohistochemical Study. *Cancer Res.*, 63(23):8511–8515, 2003.
- [65] Y. Weng, M. Cai, J. Zhu, J. Geng, K. Zhu, X. Jin, and W. Ding. Matrix Metalloproteinase Activity in Early-Stage Lung Cancer. *Onkologie*, 36(5):256–259, 2013.
- [66] T. Leinonen, R. Pirinen, J. Böhm, R. Johansson, K. Ropponen, and V.-M. Kosma. Expression of matrix metalloproteinases 7 and 9 in non-small cell lung cancer: Relation to clinicopathological factors,  $\beta$ -catenin and prognosis. *Lung Cancer*, 51(3):313–321, 2006.
- [67] W. Sienel, J. Hellers, A. Morresi-Hauf, R. Lichtinghagen, W. Mutschler, M. Jochum, C. Klein, B. Passlick, and K. Pantel. Prognostic impact of matrix metalloproteinase-9 in operable non-small cell lung cancer. *Int. J. Cancer*, 103(5):647–651, 2003.
- [68] M. Egeblad and Z. Werb. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, 2(3):161–174, 2002.
- [69] R.L. Scherer, J.O. McIntyre, and L.M. Matrisian. Imaging matrix metalloproteinases in cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 27(4):679–690, 2008.
- [70] X.-C. Cheng, H. Fang, and W.-F. Xu. Advances in assays of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, 23(2):154–167, 2008.
- [71] S. Krizkova, O. Zitka, V. Adam, R. Kizek, M. Masarik, M. Stiborova, T. Eckschlager, and G.J. Chavis. Assays for determination of matrix metalloproteinases and their activity. *Trends Anal. Chem.*, 30(11):1819–1832, 2011.
- [72] C. Lombard, J. Saulnier, and J. Wallach. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. *Biochimie*, 87(3-4):265–272, 2005.
- [73] A. Knapinska and G.B. Fields. Chemical Biology for Understanding Matrix Metalloproteinase Function. *ChemBioChem*, 13(14):2002–2020, 2012.
- [74] S. Zucker and J. Cao. Imaging metalloproteinase activity in vivo. *Nat. Med.*, 7(6):655–656, 2001.
- [75] G. Liu, J. Wang, D.S. Wunschel, and Y. Lin. Electrochemical Proteolytic Beacon for Detection of Matrix Metalloproteinase Activities. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(38):12382–12383, 2006.
- [76] Y.-P. Kim, Y.-H. Oh, E. Oh, S. Ko, M.-K. Han, and H.-S. Kim. Energy Transfer-Based Multiplexed Assay of Proteases by Using Gold Nanoparticle and Quantum Dot Conjugates on a Surface. *Anal. Chem.*, 80(12):4634–4641, 2008.
- [77] W. Pham, Y. Choi, R. Weissleder, and C.-H. Tung. Developing a Peptide-Based Near-Infrared Molecular Probe for Protease Sensing. *Bioconjugate Chem.*, 15(6):1403–1407, 2004.

- [78] J.O. McIntyre, B. Fingleton, K.S. Wells, D.W. Piston, C.C. Lynch, S. Gautam, and L.M. Matrisian. Development of a novel fluorogenic proteolytic beacon for in vivo detection and imaging of tumour-associated matrix metalloproteinase-7 activity. *Biochem. J.*, 377(3):617–628, 2004.
- [79] G. Zheng, J. Chen, Kl. Stefflova, M. Jarvi, H. Li, and B.C. Wilson. Photodynamic molecular beacon as an activatable photosensitizer based on protease-controlled singlet oxygen quenching and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(21):8989–8994, 2007.
- [80] S.S. Sidhu, H.B. Lowman, B.C. Cunningham, and J.A. Wells. Phage display for selection of novel binding peptides. In *Methods Enzymol.*, volume 328, chapter 21, pages 333–363. Academic Press, 2000.
- [81] D. Deperthes. Phage Display Substrate: A Blind Method for Determining Protease Specificity. *Biol. Chem.*, 383(7-8):1107–1112, 2002.
- [82] D.M. Jameson and J.A. Ross. Fluorescence Polarization/Anisotropy in Diagnostics and Imaging. *Chem. Rev.*, 110(5):2685–2708, 2010.
- [83] Invitrogen. *Fluorescence Polarization - Technical Resource Guide*. PanVera, 4th edition, 2006.
- [84] R.J. Hause Jr., K.K. Leung, J.L. Barkinge, M.F. Ciaccio, C. Chuu, and R.B. Jones. Comprehensive Binary Interaction Mapping of SH2 Domains via Fluorescence Polarization Reveals Novel Functional Diversification of ErbB Receptors. *PLOS ONE*, 7(9):e44471, 2012.
- [85] S.Z. Schade, M.E. Jolley, B.J. Sarauer, and L.G. Simonson. BODIPY- $\alpha$ -Casein, a pH-Independent Protein Substrate for Protease Assays Using Fluorescence Polarization. *Anal. Biochem.*, 243(1):1–7, 1996.
- [86] J.H. Kim, H.J. Shin, H. Cho, S.M. Kwak, T.S. Kim, J.Y. Kang, and E.G. Yang. A microfluidic protease activity assay based on the detection of fluorescence polarization. *Anal. Chim. Acta*, 577(2):171–177, 2006.
- [87] L. Choulier and K. Enander. Environmentally Sensitive Fluorescent Sensors Based on Synthetic Peptides. *Sensors*, 10(4):3126–3144, 2010.
- [88] G.S. Loving, M. Sainlos, and B. Imperiali. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. *Trends Biotech.*, 28(2):73–83, 2010.
- [89] G. Loving and B. Imperiali. A Versatile Amino Acid Analogue of the Solvatochromic Fluorophore 4-N,N-Dimethylamino-1,8-naphthalimide: A Powerful Tool for the Study of Dynamic Protein Interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(41):13630–13638, 2008.
- [90] M.E. Vázquez, M. Nitz, J. Stehn, M.B. Yaffe, and B. Imperiali. Fluorescent Caged Phosphoserine Peptides as Probes to Investigate Phosphorylation-Dependent Protein Associations. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(34):10150–10151, 2003.
- [91] M.E. Vázquez, D.M. Rothman, and B. Imperiali. A new environment-sensitive fluorescent amino acid for Fmoc-based solid phase peptide synthesis. *Org. Biomol. Chem.*, 2(14):1965–1966, 2004.
- [92] M.E. Vázquez, J.B. Blanco, and B. Imperiali. Photophysics and Biological Applications of the Environment-Sensitive Fluorophore 6-N,N-Dimethylamino-2,3-naphthalimide. *J. Am. Chem. Soc.*, 127(4):1300–1306, 2005.

- [93] P. Venkatraman, T.T. Nguyen, M. Sainlos, O. Bilsel, S. Chitta, B. Imperiali, and L.J. Stern. Fluorogenic probes for monitoring peptide binding to class II MHC proteins in living cells. *Nat. Chem. Biol.*, 3(4):222–228, 2007.
- [94] M. Sainlos, W.S. Iskenderian, and B. Imperiali. A General Screening Strategy for Peptide-Based Fluorogenic Ligands: Probes for Dynamic Studies of PDZ Domain-Mediated Interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 131(19):6680–6682, 2009.
- [95] E. Socher and B. Imperiali. FRET-Capture: A Sensitive Method for the Detection of Dynamic Protein Interactions. *ChemBioChem*, 14(1):53–57, 2013.
- [96] B.Z. Packard, D.D. Toptygin, A. Komoriya, and L. Brand. Profluorescent protease substrates: Intramolecular dimers described by the exciton model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(21):11640–11645, 1996.
- [97] M. Ogawa, N. Kosaka, P.L. Choyke, and H. Kobayashi. H-Type Dimer Formation of Fluorophores: A Mechanism for Activatable, in Vivo Optical Molecular Imaging. *ACS Chem. Biol.*, 4(7):535–546, 2009.
- [98] A.-P. Wei, D.K. Blumenthal, and J.N. Herron. Antibody-Mediated Fluorescence Enhancement Based on Shifting the Intramolecular Dimer-Monomer Equilibrium of Fluorescent Dyes. *Anal. Chem.*, 66(9):1500–1506, 1994.
- [99] K.F. Geoghegan, P.J. Rosner, and L.R. Hoth. Dye-Pair Reporter Systems for Protein-Peptide Molecular Interactions. *Bioconjugate Chem.*, 11(1):71–77, 2000.
- [100] B.Z. Packard, A. Komoriya, V. Nanda, and L. Brand. Intramolecular Excitonic Dimers in Protease Substrates: Modification of the Backbone Moiety To Probe the H-Dimer Structure. *J. Phys. Chem. B*, 102(10):1820–1827, 1998.
- [101] J.B. Birks. Excimers. *Rep. Prog. Phys.*, 38(8):903–974, 1975.
- [102] K.K. Karlsen, A. Okholm, J. Kjems, and J. Wengel. A quencher-free molecular beacon design based on pyrene excimer fluorescence using pyrene-labeled UNA (unlocked nucleic acid). *Bioorg. Med. Chem.*, 21(20):6186–6190, 2013.
- [103] J. Huang, Y. Wu, Y. Chen, Z. Zhu, X. Yang, C.J. Yang, K. Wang, and W. Tan. Pyrene-Excimer Probes Based on the Hybridization Chain Reaction for the Detection of Nucleic Acids in Complex Biological Fluids. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50(2):401–404, 2011.
- [104] P. Conlon, C.J. Yang, Y. Wu, Y. Chen, K. Martinez, Y. Kim, N. Stevens, A.A. Marti, S. Jockusch, N.J. Turro, and W. Tan. Pyrene Excimer Signaling Molecular Beacons for Probing Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 130(1):336–342, 2008.
- [105] R. Häner, S.M. Biner, S.M. Langenegger, T. Meng, and V.L. Malinovskii. A Highly Sensitive, Excimer-Controlled Molecular Beacon. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49(7):1227–1230, 2010.
- [106] K. Yamana, Y. Fukunaga, Y. Ohtani, S. Sato, M. Nakamura, W.J. Kim, T. Akaike, and A. Maruyama. DNA mismatch detection using a pyrene-excimer-forming probe. *Chem. Commun.*, 19:2509–2511, 2005.
- [107] H.-M. Meng, T. Fu, X.-B. Zhang, N.-N. Wang, W. Tan, G.-L. Shen, and R.-Q. Yu. Efficient Fluorescence Turn-On Probe for Zirconium via a Target-Triggered DNA Molecular Beacon Strategy. *Anal. Chem.*, 84(5):2124–2128, 2012.

- [108] X. Gao, T. Deng, J. Li, R. Yang, G. Shen, and R. Yu. New probe design strategy by co-operation of metal/DNA-ligation and supermolecule inclusion interaction: application to detection of mercury ions(II). *Analyst*, 138(9):2755–2760, 2013.
- [109] Q. Zhao and L. Cheng. Detection of thrombin using an excimer aptamer switch labeled with dual pyrene molecules. *Anal. Bioanal. Chem.*, 405(25):8233–8239, 2013.
- [110] J. Huang, Z. Zhu, S. Bamrungsap, G. Zhu, M. You, X. He, K. Wang, and W. Tan. Competition-Mediated Pyrene-Switching Aptasensor: Probing Lysozyme in Human Serum with a Monomer-Excimer Fluorescence Switch. *Anal. Chem.*, 82(24):10158–10163, 2010.
- [111] C.J. Yang, S. Jockusch, M. Vicens, N.J. Turro, and W. Tan. Light-switching excimer probes for rapid protein monitoring in complex biological fluids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(48):17278–17283, 2005.
- [112] K.J. Oh, K.J. Cash, and K.W. Plaxco. Excimer-Based Peptide Beacons: A Convenient Experimental Approach for Monitoring Polypeptide-Protein and Polypeptide-Oligonucleotide Interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(43):14018–14019, 2006.
- [113] T. Ahn, J.-S. Kim, H.-I. Choi, and C.-H. Yun. Development of Peptide Substrates for Trypsin Based on Monomer/Excimer Fluorescence of Pyrene. *Anal. Biochem.*, 306(2):247–251, 2002.
- [114] T. Förster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.*, 2(1-2):55–75, 1948.
- [115] G.T. Wang, E. Matayoshi, H.J. Huffaker, and G.A. Krafft. Design and synthesis of new fluorogenic HIV protease substrates based on resonance energy transfer. *Tetrahedron Lett.*, 31(45):6493–6496, 1990.
- [116] K. Bullok and D. Piwnica-Worms. Synthesis and Characterization of a Small, Membrane-Permeant, Caspase-Activatable Far-Red Fluorescent Peptide for Imaging Apoptosis. *J. Med. Chem.*, 48(17):5404–5407, 2005.
- [117] X. Qiu, J.R. Johnson, B.S. Wilson, S.T. Gammon, D. Piwnica-Worms, and E.M. Barnett. Single-Cell Resolution Imaging of Retinal Ganglion Cell Apoptosis In Vivo Using a Cell-Penetrating Caspase-Activatable Peptide Probe. *PLOS ONE*, 9(2):e88855, 2014.
- [118] K.E. Bullok, D. Maxwell, A.H. Kesarwala, S. Gammon, J.L. Prior, M. Snow, S. Stanley, and D. Piwnica-Worms. Biochemical and in Vivo Characterization of a Small, Membrane-Permeant, Caspase-Activatable Far-Red Fluorescent Peptide for Imaging Apoptosis. *Biochemistry*, 46(13):4055–4065, 2007.
- [119] A. Chevalier, C. Massif, P.-Y. Renard, and A. Romieu. Bioconjugatable Azo-Based Dark-Quencher Dyes: Synthesis and Application to Protease-Activatable Far-Red Fluorescent Probes. *Chem. Eur. J.*, 19(5):1686–1699, 2013.
- [120] M.V. Golynskiy, W.F. Rurup, and M. Merks. Antibody Detection by Using a FRET-Based Protein Conformational Switch. *ChemBioChem*, 11(16):2264–2267, 2010.
- [121] N.C. Shaner, P.A. Steinbach, and R.Y. Tsien. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Meth.*, 2(12):905–909, 2005.
- [122] C.-H. Tung. Fluorescent peptide probes for in vivo diagnostic imaging. *Biopolymers (Peptide Science)*, 76(5):391–403, 2004.

- [123] S. Doose, H. Neuweiler, and M. Sauer. Fluorescence Quenching by Photoinduced Electron Transfer: A Reporter for Conformational Dynamics of Macromolecules. *ChemPhysChem*, 10(9-10):1389–1398, 2009.
- [124] K.J. Oh, K.J. Cash, V. Hugenberg, and K.W. Plaxco. Peptide Beacons: A New Design for Polypeptide-Based Optical Biosensors. *Bioconjugate Chem.*, 18(3):607–609, 2007.
- [125] H. Chen, S.S. Ahsan, M.B. Santiago-Berrios, H.D. Abruña, and W.W. Webb. Mechanisms of Quenching of Alexa Fluorophores by Natural Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(21):7244–7245, 2010.
- [126] Q. Sun, R. Lu, and A. Yu. Structural Heterogeneity in the Collision Complex between Organic Dyes and Tryptophan in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B*, 116(1):660–666, 2011.
- [127] D.M. Togashi, B. Szczupak, A.G. Ryder, A. Calvet, and M. O’Loughlin. Investigating Tryptophan Quenching of Fluorescein Fluorescence under Protolytic Equilibrium. *J. Phys. Chem. A*, 113(12):2757–2767, 2009.
- [128] K.J. Oh, K.J. Cash, A.A. Lubina, and K.W. Plaxco. Chimeric peptide beacons: a direct polypeptide analog of DNA molecular beacons. *Chem. Commun.*, 2007(46):4869–4871, 2007.
- [129] J.M. Goldberg, X. Chen, N. Meinhardt, D.C. Greenbaum, and E.J. Petersson. Thioamide-Based Fluorescent Protease Sensors. *J. Am. Chem. Soc.*, 136(5):2086–2093, 2014.
- [130] J.M. Goldberg, S. Batjargal, B.S. Chen, and E.J. Petersson. Thioamide Quenching of Fluorescent Probes through Photoinduced Electron Transfer: Mechanistic Studies and Applications. *J. Am. Chem. Soc.*, 135(49):18651–18658, 2013.
- [131] M. Kasha. Collisional Perturbation of Spin Orbital Coupling and the Mechanism of Fluorescence Quenching. A Visual Demonstration of the Perturbation. *J. Chem. Phys.*, 20(1):71–74, 1952.
- [132] J. Chen, T.W.B. Liu, P.-C. Lo, B.C. Wilson, and G. Zheng. “Zipper” Molecular Beacons: A Generalized Strategy to Optimize the Performance of Activatable Protease Probes. *Bioconjugate Chem.*, 20(10):1836–1842, 2009.
- [133] K. Welser, R. Adsley, B.M. Moore, W.C. Chan, and J.W. Aylott. Protease sensing with nanoparticle based platforms. *Analyst*, 136(1):29–41, 2011.
- [134] W.W. Yu, L. Qu, W. Guo, and X. Peng. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals. *Chem. Mater.*, 15(14):2854–2860, 2003.
- [135] M. Zhou and I. Ghosh. Quantum dots and peptides: A bright future together. *Biopolymers (Peptide Science)*, 88(3):325–339, 2007.
- [136] W.R. Algar, A.J. Tavares, and U.J. Krull. Beyond labels: A review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction. *Anal. Chim. Acta*, 673(1):1–25, 2010.
- [137] M.K. Wagner, F. Li, J. Li, X.-F. Li, and X.C. Le. Use of quantum dots in the development of assays for cancer biomarkers. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397(8):3213–3224, 2010.
- [138] Z. Jin and N. Hildebrandt. Semiconductor quantum dots for in vitro diagnostics and cellular imaging. *Trends Biotech.*, 30(7):394–403, 2012.

- [139] E. Petryayeva, W.R. Algar, and I.L. Medintz. Quantum Dots in Bioanalysis: A Review of Applications Across Various Platforms for Fluorescence Spectroscopy and Imaging. *Appl. Spectrosc.*, 67(3):215–252, 2013.
- [140] I.L. Medintz, H.T. Uyeda, E.R. Goldman, and H. Mattoussi. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mat.*, 4(6):435–446, 2005.
- [141] E. Hutter and D. Maysinger. Gold-nanoparticle-based biosensors for detection of enzyme activity. *Trends Pharmacol. Sci.*, 34(9):497–507, 2013.
- [142] D. Deng, D. Zhang, Y. Li, S. Achilefu, and Y. Gu. Gold nanoparticles based molecular beacons for in vitro and in vivo detection of the matriptase expression on tumor. *Biosens. Bioelectron.*, 49(0):216–221, 2013.
- [143] K. Uhland. Matriptase and its putative role in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63(24):2968–2978, 2006.
- [144] A. Welman, D. Sproul, P. Mullen, M. Muir, A.R. Kinnaird, D.J. Harrison, D. Faratian, V.G. Brunton, and M.C. Frame. Diversity of Matriptase Expression Level and Function in Breast Cancer. *PLOS ONE*, 7(4):e34182, 2012.
- [145] J.-S. Jin, D.-S. Hsieh, S.-H. Loh, A. Chen, C.-W. Yao, and C.-Y. Yen. Increasing expression of serine protease matriptase in ovarian tumors: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters. *Mod. Pathol.*, 19(3):447–452, 2006.
- [146] S.Y. Park, S.M. Lee, G.B. Kim, and Y.-P. Kim. Gold nanoparticle-based fluorescence quenching via metal coordination for assaying protease activity. *Gold Bull.*, 45(4):213–219, 2012.
- [147] I.-C. Sun, S. Lee, H. Koo, I.C. Kwon, K. Choi, C.-H. Ahn, and K. Kim. Caspase Sensitive Gold Nanoparticle for Apoptosis Imaging in Live Cells. *Bioconjugate Chem.*, 21(11):1939–1942, 2010.
- [148] K. Kerman and H.-B. Kraatz. Electrochemical probing of HIV enzymes using ferrocene-conjugated peptides on surfaces. *Analyst*, 134(12):2400–2404, 2009.
- [149] K. Kerman, K.A. Mahmoud, and H.-B. Kraatz. An electrochemical approach for the detection of HIV-1 protease. *Chem. Commun.*, 37:3829–3831, 2007.
- [150] P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg, and O. Buchardt. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, 254(5037):1497–1500, 1991.
- [151] B. Hyrup and P.E. Nielsen. Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, properties and potential applications. *Bioorg. Med. Chem.*, 4(1):5–23, 1996.
- [152] P.E. Nielsen and M. Egholm. An Introduction to Peptide Nucleic Acid. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 1(2):89–104, 1999.
- [153] V.V. Demidov, V.N. Potaman, M.D. Frank-Kamenetskii, M. Egholm, O. Buchard, S.H. Sönnichsen, and P.E. Nielsen. Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. *Biochem. Pharmacol.*, 48(6):1310–1313, 1994.
- [154] H. Rasmussen, J.S. Kastrup, J.N. Nielsen, J.M. Nielsen, and P.E. Nielsen. Crystal structure of a peptide nucleic acid (PNA) duplex at 1.7 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.*, 4(2):98–101, 1997.



- [155] M. Eriksson and P.E. Nielsen. Solution structure of a peptide nucleic acid-DNA duplex. *Nat. Struct. Biol.*, 3(5):410–413, 1996.
- [156] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S.M. Freier, D.A. Driver, R.H. Berg, S.K. Kim, B. Norden, and P.E. Nielsen. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*, 365(6446):566–568, 1993.
- [157] P. Wittung, P.E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, and B. Nordén. DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid. *Nature*, 368(6471):561–563, 1994.
- [158] T. Ratilainen, A. Holmén, E. Tuite, G. Haaima, L. Christensen, P.E. Nielsen, and B. Nordén. Hybridization of Peptide Nucleic Acid. *Biochemistry*, 37(35):12331–12342, 1998.
- [159] T.N. Grossmann and O. Seitz. DNA-Catalyzed Transfer of a Reporter Group. *J. Am. Chem. Soc.*, 128(49):15596–15597, 2006.
- [160] T.N. Grossmann, L. Röglin, and O. Seitz. Target-Catalyzed Transfer Reactions for the Amplified Detection of RNA. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47(37):7119–7122, 2008.
- [161] X.-H. Chen, A. Roloff, and O. Seitz. Consecutive Signal Amplification for DNA Detection Based on De Novo Fluorophore Synthesis and Host-Guest Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51(18):4479–4483, 2012.
- [162] C. Dose and O. Seitz. Single nucleotide specific detection of DNA by native chemical ligation of fluorescence labeled PNA-probes. *Bioorg. Med. Chem.*, 16(1):65–77, 2008.
- [163] A. Roloff and O. Seitz. The role of reactivity in DNA templated native chemical PNA ligation during PCR. *Bioorg. Med. Chem.*, 21(12):3458–3464, 2013.
- [164] A. Roloff and O. Seitz. Bioorthogonal reactions challenged: DNA templated native chemical ligation during PCR. *Chem. Sci.*, 4(1):432–436, 2013.
- [165] E. Socher, L. Bethge, A. Knoll, N. Jungnick, A. Herrmann, and O. Seitz. Low-Noise Stemless PNA Beacons for Sensitive DNA and RNA Detection. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47(49):9555–9559, 2008.
- [166] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, and O. Seitz. Fluorescence Imaging of Influenza H1N1 mRNA in Living Infected Cells Using Single-Chromophore FIT-PNA. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50(8):1931–1934, 2011.
- [167] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, and O. Seitz. PNA FIT-Probes for the Dual Color Imaging of Two Viral mRNA Targets in Influenza H1N1 Infected Live Cells. *Bioconjugate Chem.*, 23(10):2051–2060, 2012.
- [168] A.S. Lygina, K. Meyenberg, R. Jahn, and U. Diederichsen. Transmembrane Domain Peptide/Peptide Nucleic Acid Hybrid as a Model of a SNARE Protein in Vesicle Fusion. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50(37):8597–8601, 2011.
- [169] A. Erben, T.N. Grossmann, and O. Seitz. DNA-Triggered Synthesis and Bioactivity of Proapoptotic Peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50(12):2828–2832, 2011.
- [170] A. Erben, T.N. Grossmann, and O. Seitz. DNA-instructed acyl transfer reactions for the synthesis of bioactive peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21(17):4993–4997, 2011.
- [171] O. Vazquez and O. Seitz. Cytotoxic peptide-PNA conjugates obtained by RNA-programmed peptidyl transfer with turnover. *Chem. Sci.*, 5(7):2850–2854, 2014.

- [172] L. Röglin, M.R. Ahmadian, and O. Seitz. DNA-Controlled Reversible Switching of Peptide Conformation and Bioactivity. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46(15):2704–2707, 2007.
- [173] L. Röglin, F. Altenbrunn, and O. Seitz. DNA and RNA-Controlled Switching of Protein Kinase Activity. *ChemBioChem*, 10(4):758–765, 2009.
- [174] K. Ketomäki and H. Lönnberg. A Mixed-Phase Immunoassay Based on Simultaneous Binding of Fluorescently Tagged and PNA-Conjugated Peptide Epitopes on Antibodies: Quantification on PNA-Coated Microparticles. *Bioconjugate Chem.*, 17(4):1063–1068, 2006.
- [175] H. Kashida, T. Takatsu, T. Fujii, K. Sekiguchi, X. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, and H. Asanuma. In-Stem Molecular Beacon Containing a Pseudo Base Pair of Threoninol Nucleotides for the Removal of Background Emission. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 48(38):7044–7047, 2009.
- [176] G. Bonnet, S. Tyagi, A. Libchaber, and F.R. Kramer. Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(11):6171–6176, 1999.
- [177] S.A. Thomson, J.A. Josey, R. Cadilla, M.D. Gaul, C.F. Hassman, M.J. Luzzio, A.J. Pipe, K.L. Reed, D.J. Ricca, R.W. Wiethe, and S.A. Noble. Fmoc mediated synthesis of Peptide Nucleic Acids. *Tetrahedron*, 51(22):6179–6194, 1995.
- [178] D.V. Jarikote, O. Köhler, E. Socher, and O. Seitz. Divergent and Linear Solid-Phase Synthesis of PNA Containing Thiazole Orange as Artificial Base. *Eur. J. Org. Chem.*, 2005(15):3187–3195, 2005.
- [179] O. Seitz and O. Köhler. Convergent Strategies for the Attachment of Fluorescing Reporter Groups to Peptide Nucleic Acids in Solution and on Solid Phase. *Chem. Eur. J.*, 7(18):3911–3925, 2001.
- [180] J.E. Ladbury, M.A. Lemmon, M. Zhou, J. Green, M.C. Botfield, and J. Schlessinger. Measurement of the binding of tyrosyl phosphopeptides to SH2 domains: A reappraisal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(8):3199–3203, 1995.
- [181] M.A. Lemmon and J.E. Ladbury. Thermodynamic Studies of Tyrosyl-Phosphopeptide Binding to the SH2 Domain of p56 lck. *Biochemistry*, 33(17):5070–5076, 1994.
- [182] L. Röglin. PNA-Peptid-Chimären: Werkzeug zur hybridisierungsbasierten Kontrolle der Peptidkonformation und für Protease-Screenings. Dissertation, 2008.
- [183] S. Thurley. Hairpin Peptide Beacon: Dualmarkierte PNA-Peptid-Hybride zur Proteindektektion. Dissertation, 2010.
- [184] G. Payne, S.E. Shoelson, G.D. Gish, T. Pawson, and C.T. Walsh. Kinetics of p56lck and p60src Src homology 2 domain binding to tyrosine-phosphorylated peptides determined by a competition assay or surface plasmon resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(11):4902–4906, 1993.
- [185] J.H. Kim, D. Morikis, and M. Ozkan. Adaptation of inorganic quantum dots for stable molecular beacons. *Sens. Actuators B*, 102(2):315–319, 2004.
- [186] T. Kaji, S. Ito, S. Iwai, and H. Miyasaka. Nanosecond to Submillisecond Dynamics in Dye-Labeled Single-Stranded DNA, As Revealed by Ensemble Measurements and Photon Statistics at Single-Molecule Level. *J. Phys. Chem. B*, 113(42):13917–13925, 2009.

- [187] M. Torimura, S. Kurata, K. Yamada, T. Yokomaku, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane. Fluorescence-Quenching Phenomenon by Photoinduced Electron Transfer between a Fluorescent Dye and a Nucleotide Base. *Anal. Sci.*, 17(1):155–160, 2001.
- [188] Y. Hara, T. Fujii, H. Kashida, K. Sekiguchi, X.G. Liang, K. Niwa, T. Takase, Y. Yoshida, and H. Asanuma. Coherent Quenching of a Fluorophore for the Design of a Highly Sensitive In-Stem Molecular Beacon. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49(32):5502–5506, 2010.
- [189] H. Asanuma, T. Osawa, H. Kashida, T. Fujii, X. Liang, K. Niwa, Y. Yoshida, N. Shimada, and A. Maruyama. A polycation-chaperoned in-stem molecular beacon system. *Chem. Commun.*, 48(12):1760–1762, 2012.
- [190] K.F. MacKinnon, D.F. Qualley, and S.A. Woski. Polycyclic aromatic hydrocarbons as universal bases in peptide nucleic acid. *Tetrahedron Lett.*, 48(45):8074–8077, 2007.
- [191] J.M. Bradshaw, R.A. Grucza, J.E. Ladbury, and G. Waksman. Probing the "Two-Pronged Plug Two-Holed Socket" Model for the Mechanism of Binding of the Src SH2 Domain to Phosphotyrosyl Peptides: A Thermodynamic Study. *Biochemistry*, 37(25):9083–9090, 1998.
- [192] T. Wiseman, S. Williston, J.F. Brandts, and L.-N. Lin. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.*, 179(1):131–137, 1989.
- [193] N. Arora and B. Jayaram. Energetics of Base Pairs in B-DNA in Solution: An Appraisal of Potential Functions and Dielectric Treatments. *J. Phys. Chem. B*, 102(31):6139–6144, 1998.
- [194] J.M. Bradshaw and G. Waksman. Calorimetric Examination of High-Affinity Src SH2 Domain-Tyrosyl Phosphopeptide Binding: Dissection of the Phosphopeptide Sequence Specificity and Coupling Energetics. *Biochemistry*, 38(16):5147–5154, 1999.
- [195] J.D. Dunitz. Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chem. Biol.*, 2(11):709–712, 1995.
- [196] K. Sharp. Entropy-enthalpy compensation: Fact or artifact? *Protein Science*, 10(3):661–667, 2001.
- [197] M. Fischbach. Dualmarkierte Hairpin Peptide Beacon zur Untersuchung der MHC II-Peptid-Interaktion. Diplomarbeit, 2009.
- [198] S. Ficht, L. Röglin, M. Ziehe, D. Breyer, and O. Seitz. Direct Carbodiimide-Mediated Conjugation of Carboxylates Using Pyridinium p-Toluenesulfonate and Tertiary Amines as Additives. *Synlett*, 2004(14):2525–2528, 2004.
- [199] H.-G. Chao, B. Leiting, P.D. Reiss, A.L. Burkhardt, C.E. Klimas, J.B. Bolen, and G.R. Matsueda. Synthesis and Application of Fmoc-O-[Bis(dimethylamino)phosphono]tyrosine, a Versatile Protected Phosphotyrosine Equivalent. *J. Org. Chem.*, 60(24):7710–7711, 1995.
- [200] Berechnungsprogramm der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Oliver Seitz. <http://www2.chemie.hu-berlin.de/seitz/oligo-tools.htm>.
- [201] PNA Quantifizierung von Panagene. <http://www.panagene.com>, 2008.
- [202] B.J.H. Kuipers and H. Gruppen. Prediction of Molar Extinction Coefficients of Proteins and Peptides Using UV Absorption of the Constituent Amino Acids at 214 nm To Enable Quantitative Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry Analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 55(14):5445–5451, 2007.

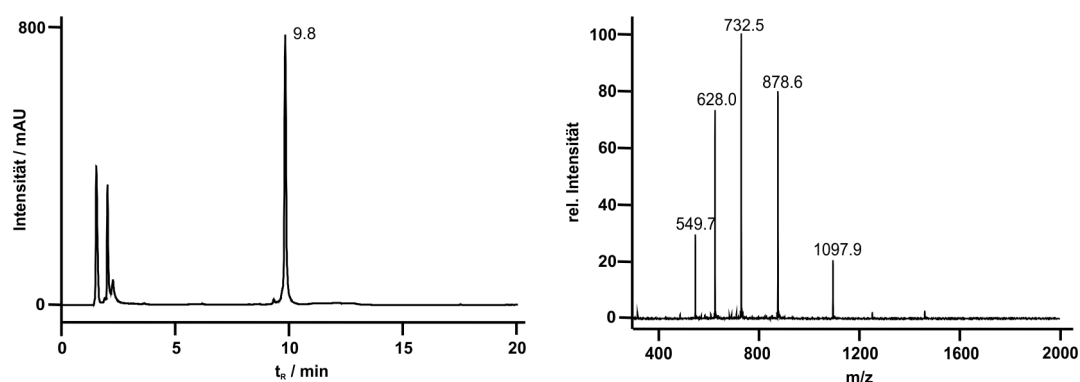


# A Analytik der synthetisierten Verbindungen

## A.1 Chromatogramme und Massenspektren

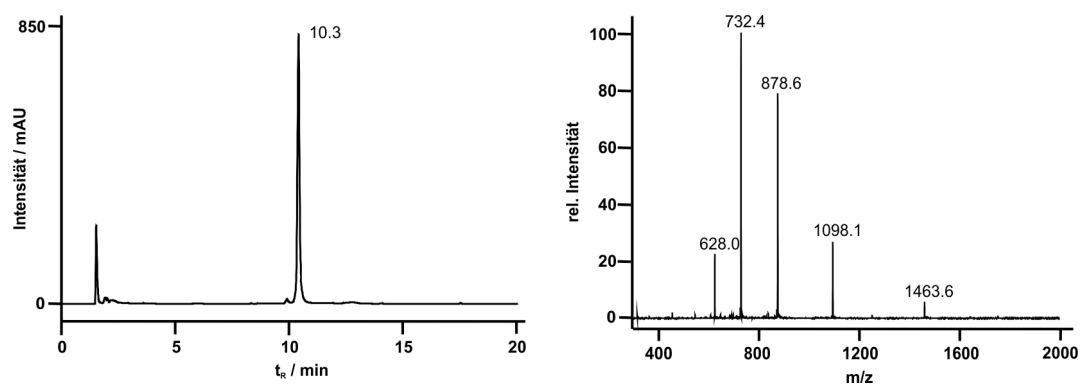
### A.1.1 Verbindungen aus Kapitel 4.4.1

#### H-DD-K(FAM)-*gttg*-PQpYEEIPI-*caac*-K(Dabcyl)-G-NH<sub>2</sub> (34)



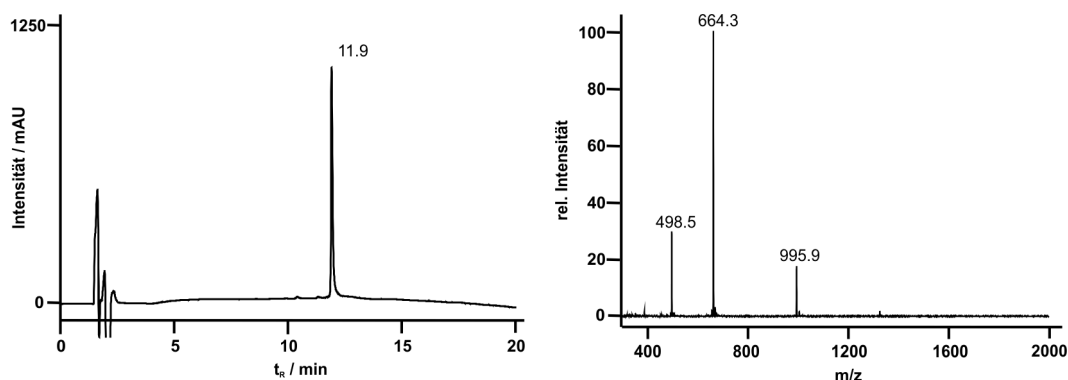
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 549.5 [M+8H]<sup>8+</sup>, 627.9 [M+7H]<sup>7+</sup>, 732.4 [M+6H]<sup>6+</sup>, 878.7 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1098.1 [M+4H]<sup>4+</sup>  
 gef.: 549.7 [M+8H]<sup>8+</sup>, 628.0 [M+7H]<sup>7+</sup>, 732.5 [M+6H]<sup>6+</sup>, 878.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1097.9 [M+4H]<sup>4+</sup>

#### H-DD-*gttg*-K(FAM)-PQpYEEIPI-K(Dabcyl)-*caac*-G-NH<sub>2</sub> (35)



ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 627.9 [M+7H]<sup>7+</sup>, 732.4 [M+6H]<sup>6+</sup>, 878.7 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1098.1 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1463.8 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 628.0 [M+7H]<sup>7+</sup>, 732.4 [M+6H]<sup>6+</sup>, 878.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1098.1 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1463.6 [M+3H]<sup>3+</sup>

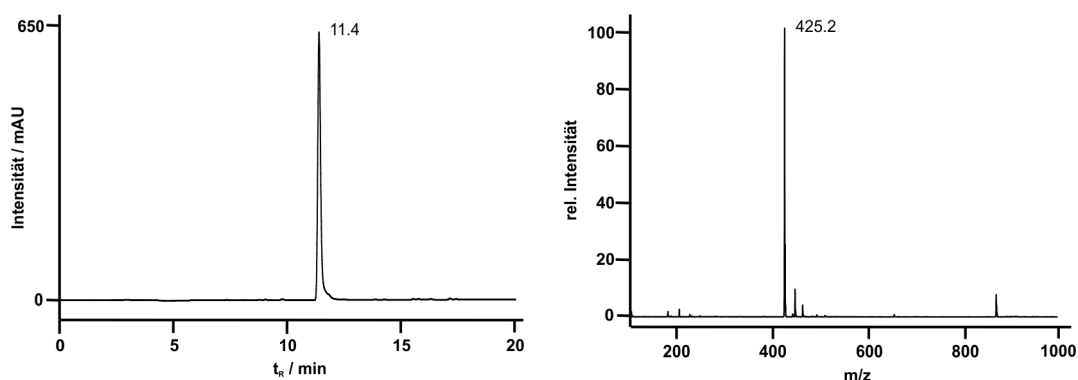
### H-K(FAM)-PQpYEEIPI-K(Dabcyl)-G-NH<sub>2</sub> (36)



ESI-MS (m/z): ber.: 498.5 [M+4H]<sup>4+</sup>, 664.4 [M+3H]<sup>3+</sup>, 996.0 [M+2H]<sup>2+</sup>  
 gef.: 498.5 [M+4H]<sup>4+</sup>, 664.3 [M+3H]<sup>3+</sup>, 995.9 [M+2H]<sup>2+</sup>

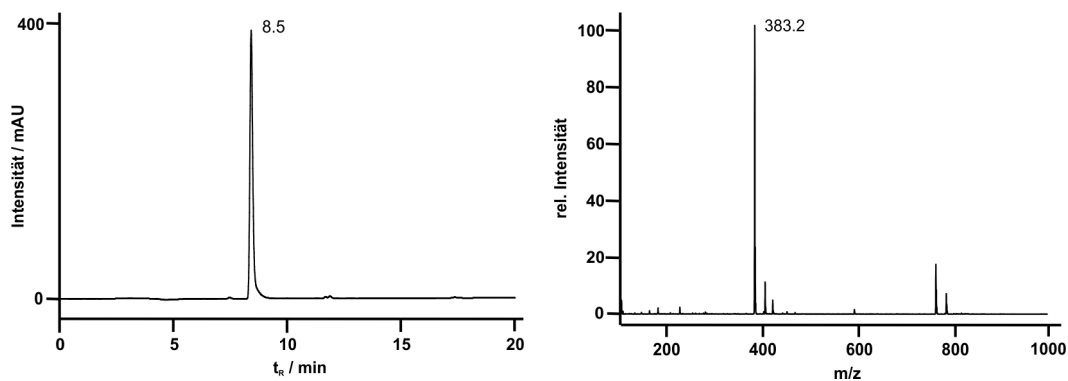
### A.1.2 Modifizierte PNA-Monomere

#### Fmoc-Aeg(Alloc)-OH (39)



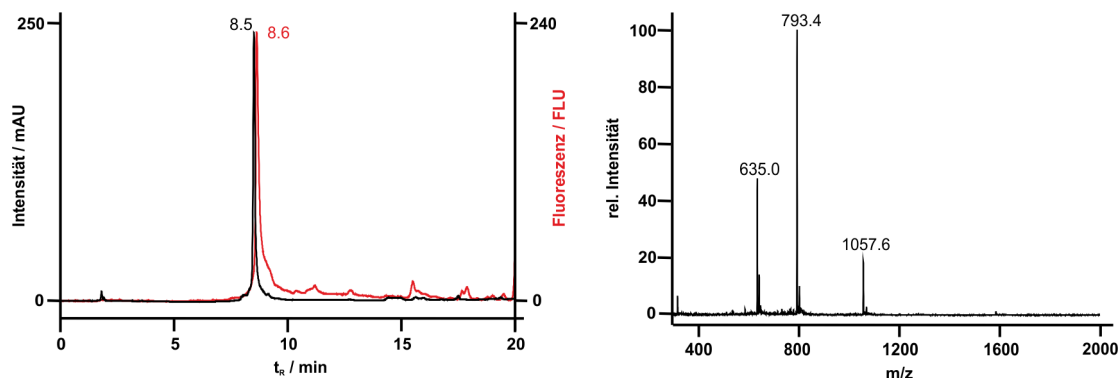
ESI-MS (m/z): ber.: 425.5 [M+H]<sup>+</sup>  
 gef.: 425.2 [M+H]<sup>+</sup>

#### Fmoc-Aeg(Ac)-OH (40)

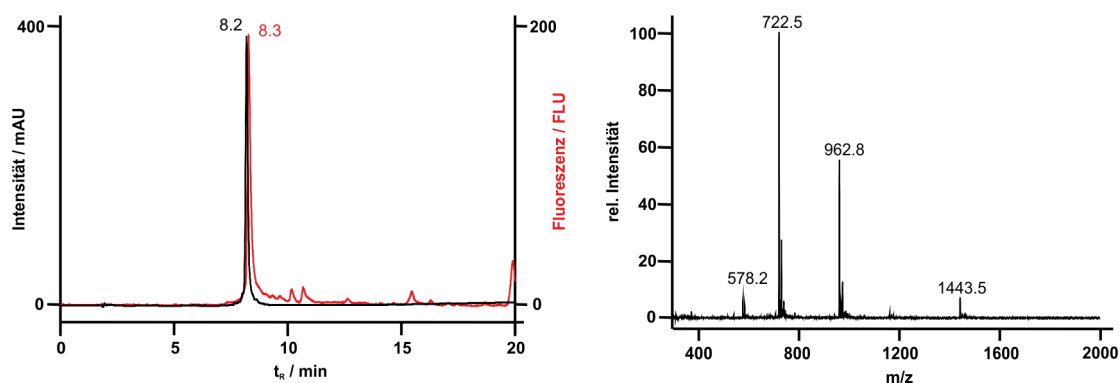


ESI-MS (m/z): ber.: 383.4 [M+H]<sup>+</sup>  
 gef.: 383.2 [M+H]<sup>+</sup>

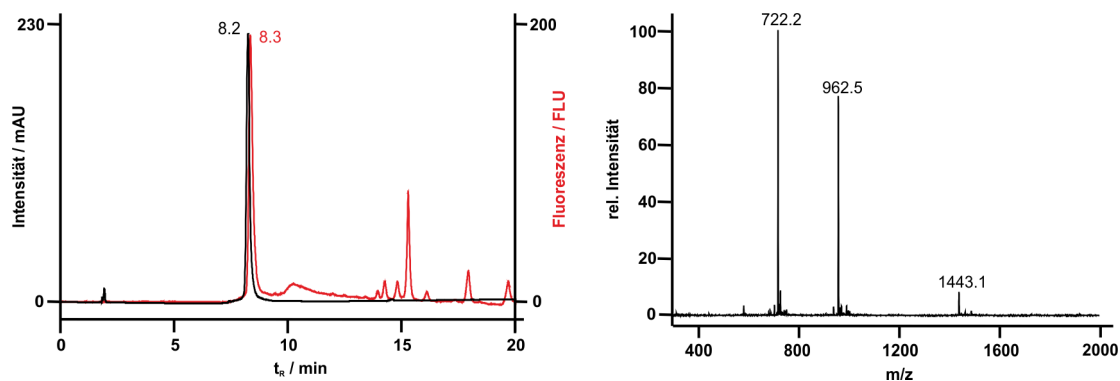
## A.1.3 Verbindungen aus Kapitel 4.4.4

H-g-P2-S-g-PQpYEEIPI-c-Q-S-c-G-NH<sub>2</sub> (46)

ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 635.0  $[M+5H]^{5+}$ , 793.6  $[M+4H]^{4+}$ , 1057.7  $[M+3H]^{3+}$   
 gef.: 635.0  $[M+5H]^{5+}$ , 793.4  $[M+4H]^{4+}$ , 1057.6  $[M+3H]^{3+}$

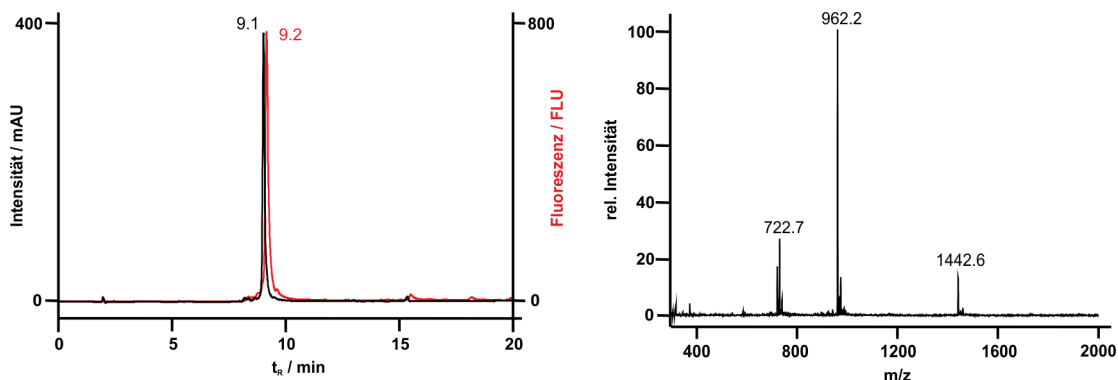
H-g-P2-g-PQpYEEIPI-c-Q-c-G-NH<sub>2</sub> (47)

ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 578.2  $[M+5H]^{5+}$ , 722.5  $[M+4H]^{4+}$ , 963.0  $[M+3H]^{3+}$ , 1443.9  $[M+2H]^{2+}$   
 gef.: 578.2  $[M+5H]^{5+}$ , 722.5  $[M+4H]^{4+}$ , 962.8  $[M+3H]^{3+}$ , 1443.5  $[M+2H]^{2+}$

H-t-P2-g-PQpYEEIPI-c-Q-a-G-NH<sub>2</sub> (48)

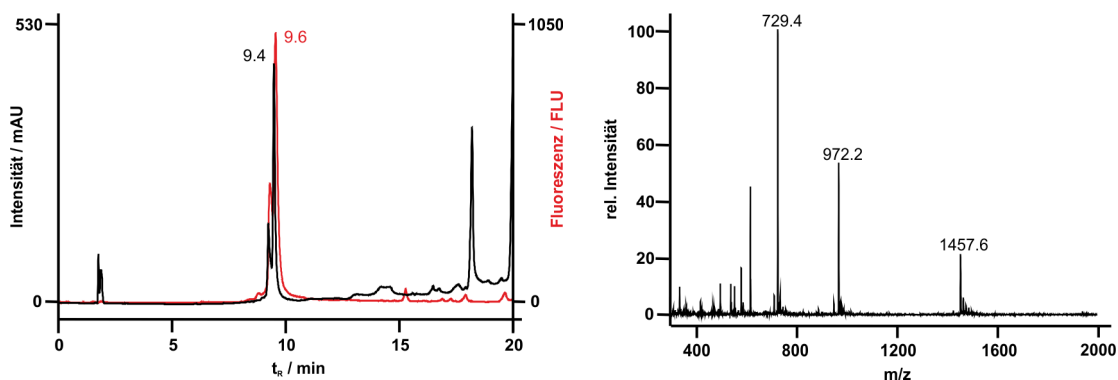
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 722.2  $[M+4H]^{4+}$ , 962.6  $[M+3H]^{3+}$ , 1443.5  $[M+2H]^{2+}$   
 gef.: 722.2  $[M+4H]^{4+}$ , 962.5  $[M+3H]^{3+}$ , 1443.1  $[M+2H]^{2+}$

**H-t-P2-t-PQpYEEIPI-a-Q-a-G-NH<sub>2</sub> (49)**



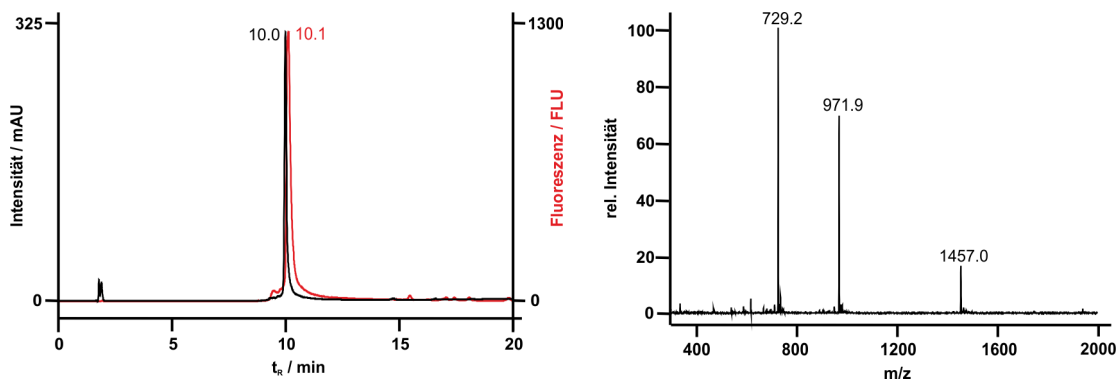
ESI-MS (m/z): ber.: 722.0 [M+4H]<sup>4+</sup>, 962.3 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1443.0 [M+2H]<sup>2+</sup>  
 gef.: 722.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 962.2 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1442.6 [M+2H]<sup>2+</sup>

**H-g-P4-g-PQpYEEIPI-c-Q-c-G-NH<sub>2</sub> (50)**



ESI-MS (m/z): ber.: 729.5 [M+4H]<sup>4+</sup>, 972.3 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1458.0 [M+2H]<sup>2+</sup>  
 gef.: 729.4 [M+4H]<sup>4+</sup>, 972.2 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1457.6 [M+2H]<sup>2+</sup>

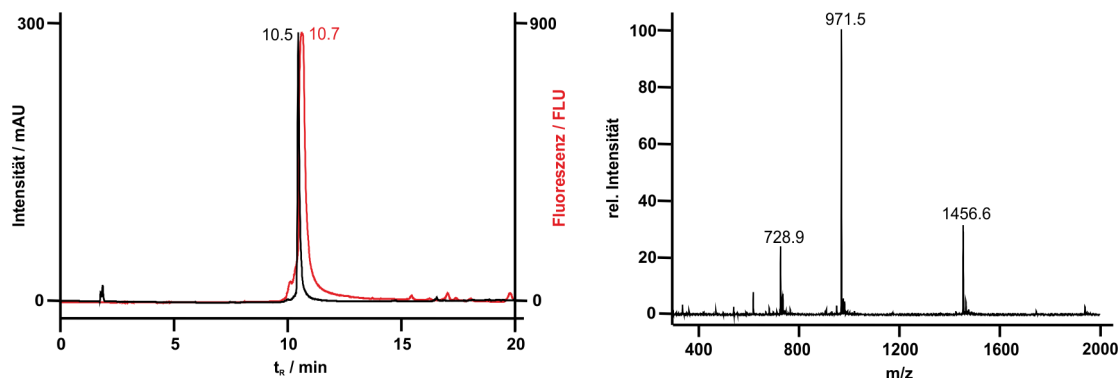
**H-t-P4-g-PQpYEEIPI-c-Q-a-G-NH<sub>2</sub> (51)**



ESI-MS (m/z): ber.: 729.2 [M+4H]<sup>4+</sup>, 972.0 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1457.5 [M+2H]<sup>2+</sup>  
 gef.: 729.2 [M+4H]<sup>4+</sup>, 971.9 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1457.0 [M+2H]<sup>2+</sup>

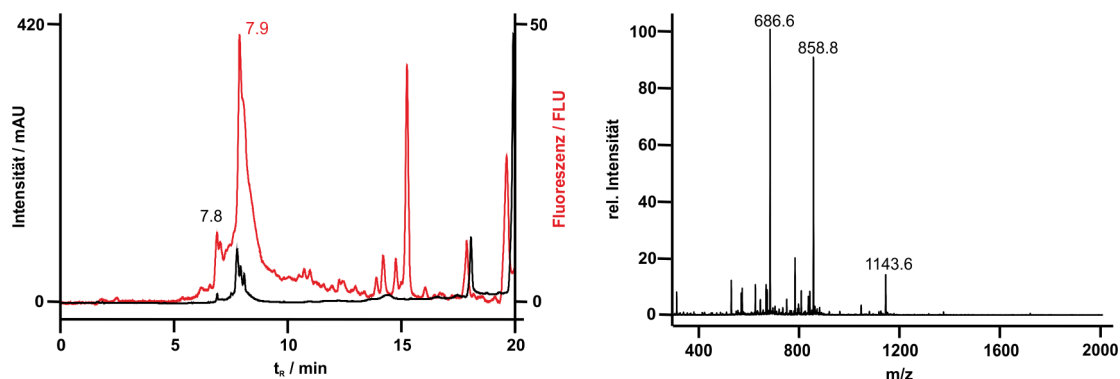


### H-t-P4-t-PQpYEEIPI-a-Q-a-G-NH<sub>2</sub> (52)



ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 729.0  $[M+4H]^{4+}$ , 971.7  $[M+3H]^{3+}$ , 1457.0  $[M+2H]^{2+}$   
 gef.: 728.9  $[M+4H]^{4+}$ , 971.5  $[M+3H]^{3+}$ , 1456.6  $[M+2H]^{2+}$

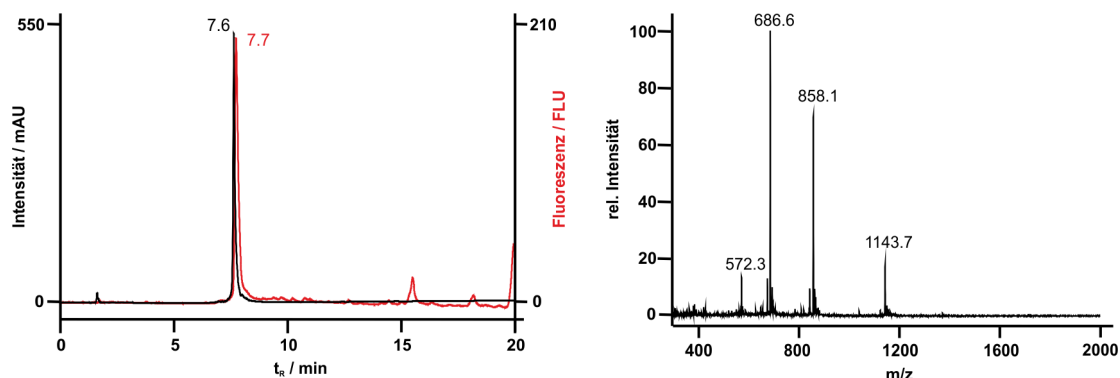
### H-gg-P2-g-PQpYEEIPI-c-Q-cc-G-NH<sub>2</sub> (53)



ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 686.7  $[M+5H]^{5+}$ , 858.1  $[M+4H]^{4+}$ , 1143.9  $[M+3H]^{3+}$   
 gef.: 686.6  $[M+5H]^{5+}$ , 858.0  $[M+4H]^{4+}$ , 1143.6  $[M+3H]^{3+}$

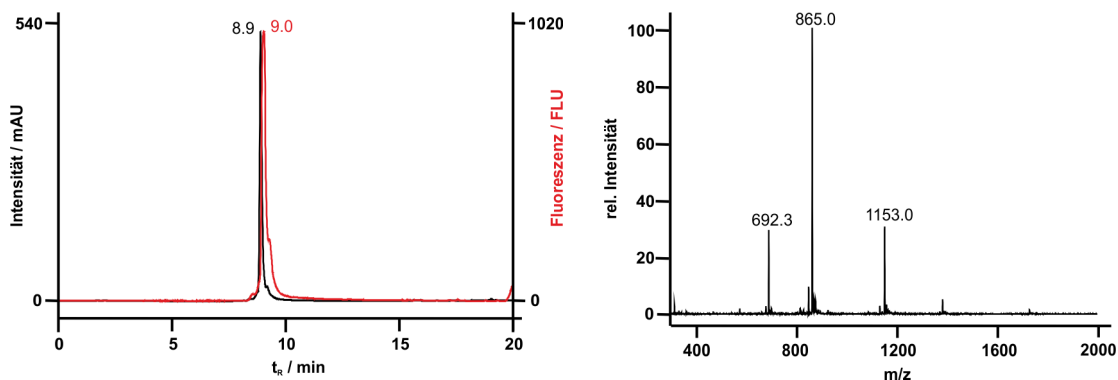
Das unsaubere Chromatogramm ist auf eine Störung des HPLC-Laufes zurückzuführen. Eine Wiederholung war aufgrund der geringen Substanzmenge ausgeschlossen. Der Verwendung der Sonde fand unter Vorbehalt statt.

### H-g-P2-gg-PQpYEEIPI-cc-Q-c-G-NH<sub>2</sub> (54)



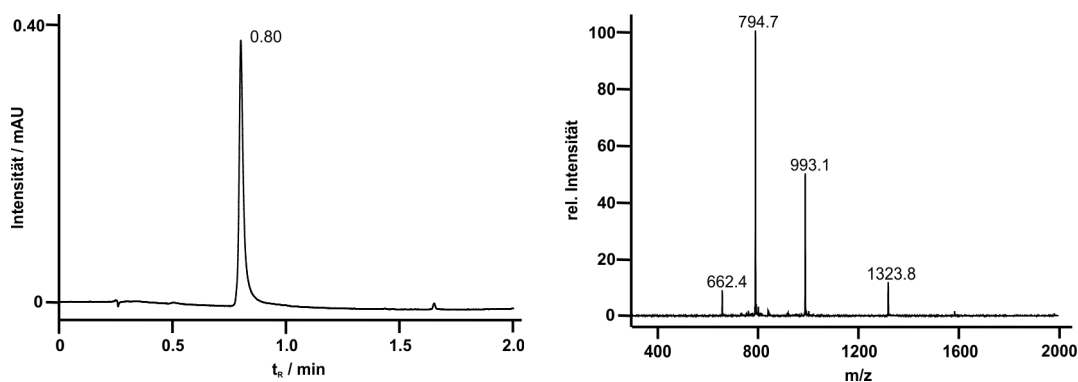
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 572.4  $[M+6H]^{6+}$ , 686.7  $[M+5H]^{5+}$ , 858.1  $[M+4H]^{4+}$ , 1143.8  $[M+3H]^{3+}$   
 gef.: 572.3  $[M+6H]^{6+}$ , 686.6  $[M+5H]^{5+}$ , 858.1  $[M+4H]^{4+}$ , 1143.7  $[M+3H]^{3+}$

**H-g-P4-gg-PQpYEEIPI-cc-Q-c-G-NH<sub>2</sub> (55)**



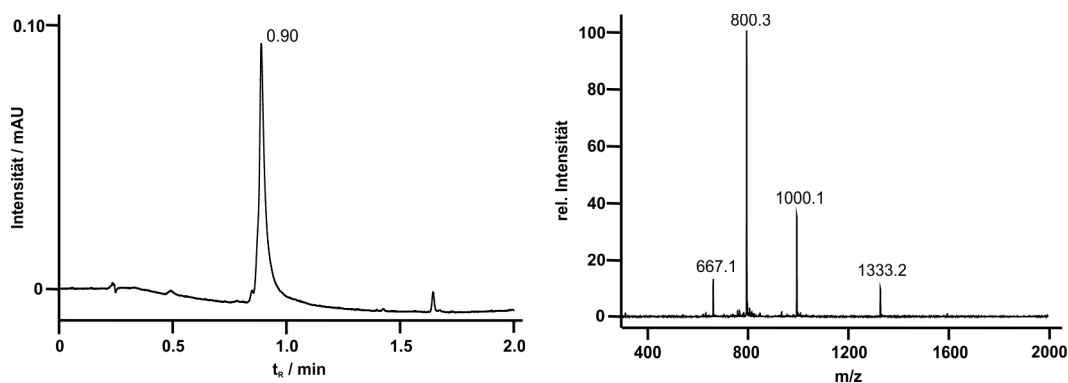
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 692.3  $[M+5H]^{5+}$ , 865.1  $[M+4H]^{4+}$ , 1153.2  $[M+3H]^{3+}$   
 gef.: 692.3  $[M+5H]^{5+}$ , 865.0  $[M+4H]^{4+}$ , 1153.0  $[M+3H]^{3+}$

**H-ga-P2-ag-PQpYEEIPI-ct-Q-tc-G-NH<sub>2</sub> (56)**



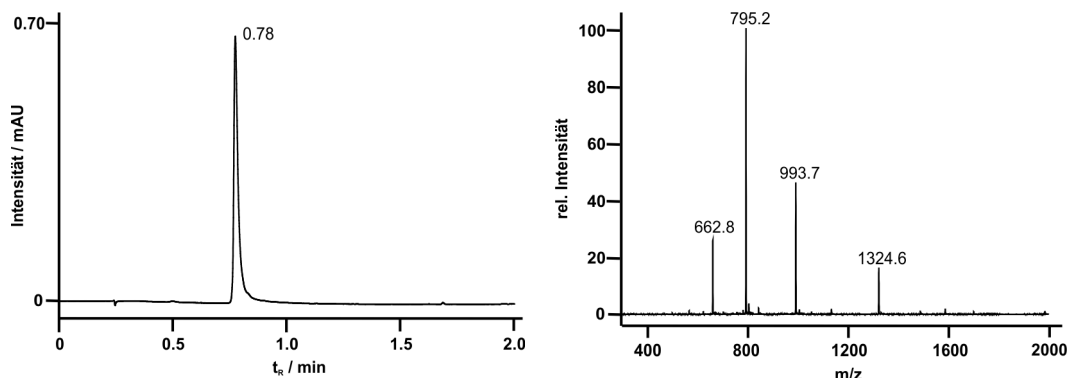
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 662.5  $[M+6H]^{6+}$ , 794.8  $[M+5H]^{5+}$ , 993.2  $[M+4H]^{4+}$ , 1324.0  $[M+3H]^{3+}$   
 gef.: 662.4  $[M+6H]^{6+}$ , 794.7  $[M+5H]^{5+}$ , 993.1  $[M+4H]^{4+}$ , 1323.8  $[M+3H]^{3+}$

**H-ga-P4-ag-PQpYEEIPI-ct-Q-tc-G-NH<sub>2</sub> (57)**



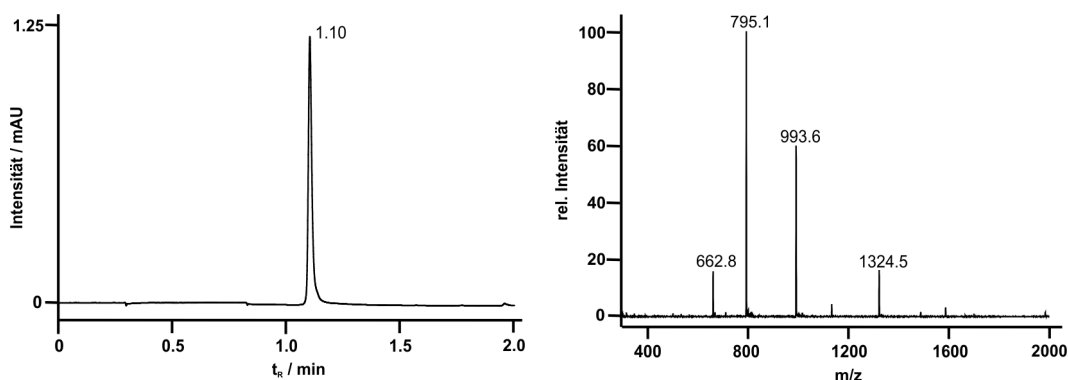
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 667.2  $[M+6H]^{6+}$ , 800.4  $[M+5H]^{5+}$ , 1000.3  $[M+4H]^{4+}$ , 1333.3  $[M+3H]^{3+}$   
 gef.: 667.1  $[M+6H]^{6+}$ , 800.3  $[M+5H]^{5+}$ , 1000.1  $[M+4H]^{4+}$ , 1333.2  $[M+3H]^{3+}$

### H-gg-P2-gg-PQpYEEIPI-cc-Q-cc-G-NH<sub>2</sub> (58)



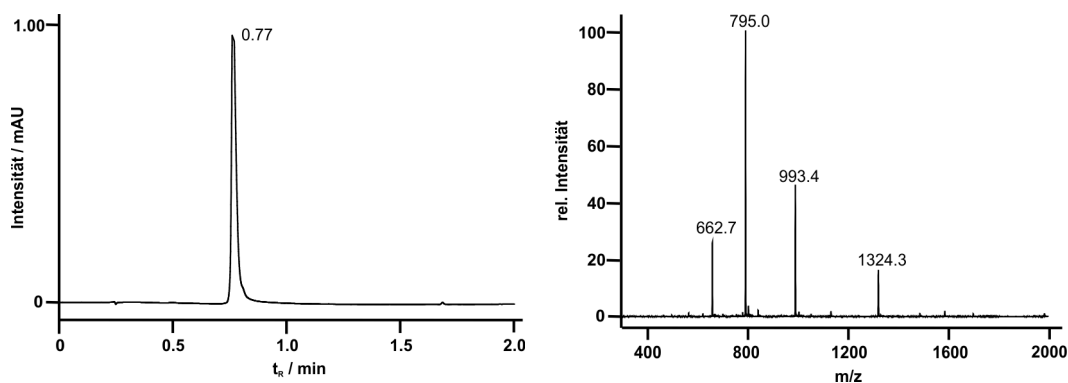
ESI-MS (m/z): ber.: 662.8 [M+6H]<sup>6+</sup>, 795.2 [M+5H]<sup>5+</sup>, 993.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1324.6 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 662.8 [M+6H]<sup>6+</sup>, 795.2 [M+5H]<sup>5+</sup>, 993.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1324.6 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-cc-P2-cc-PQpYEEIPI-gg-Q-gg-G-NH<sub>2</sub> (59)



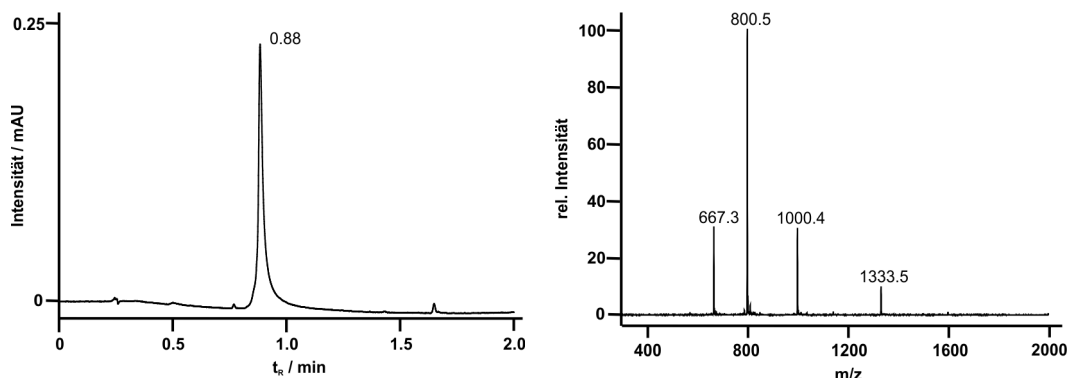
ESI-MS (m/z): ber.: 662.8 [M+6H]<sup>6+</sup>, 795.2 [M+5H]<sup>5+</sup>, 993.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1324.6 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 662.8 [M+6H]<sup>6+</sup>, 795.1 [M+5H]<sup>5+</sup>, 993.6 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1324.5 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-tg-P2-gg-PQpYEEIPI-cc-Q-ca-G-NH<sub>2</sub> (60)



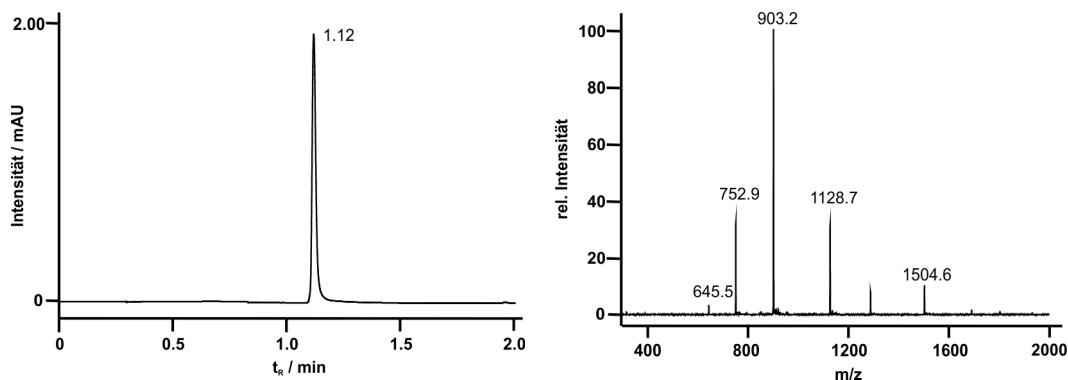
ESI-MS (m/z): ber.: 662.8 [M+6H]<sup>6+</sup>, 795.2 [M+5H]<sup>5+</sup>, 993.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1324.6 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 662.7 [M+6H]<sup>6+</sup>, 795.0 [M+5H]<sup>5+</sup>, 993.4 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1324.3 [M+3H]<sup>3+</sup>

**H-gg-P2-gg-PQpYEEIPI-cc-Q-cc-G-NH<sub>2</sub> (61)**



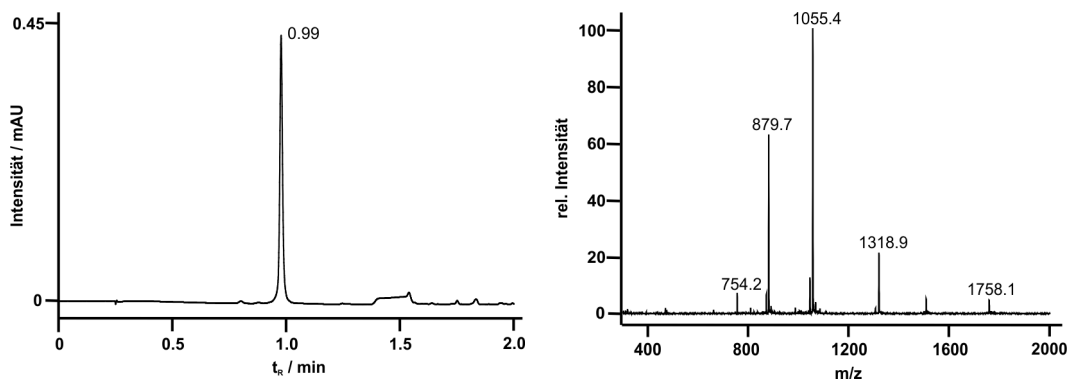
ESI-MS (m/z): ber.: 667.3 [M+6H]<sup>6+</sup>, 800.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1000.5 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1333.7 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 667.3 [M+6H]<sup>6+</sup>, 800.5 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1000.4 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1333.5 [M+3H]<sup>3+</sup>

**H-cca-P2-ac-PQpYEEIPI-gt-Q-tgg-G-NH<sub>2</sub> (62)**



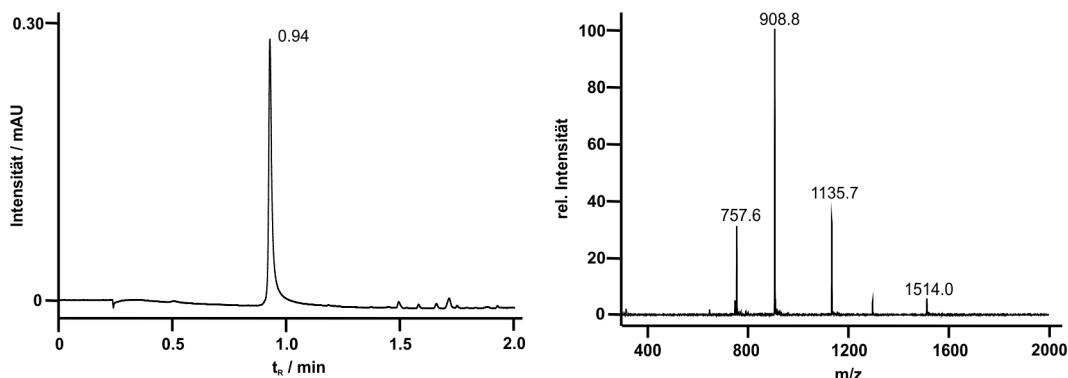
ESI-MS (m/z): ber.: 645.5 [M+7H]<sup>7+</sup>, 752.9 [M+6H]<sup>6+</sup>, 903.3 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1128.9 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1504.8 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 645.5 [M+7H]<sup>7+</sup>, 752.9 [M+6H]<sup>6+</sup>, 903.2 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1128.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1504.6 [M+3H]<sup>3+</sup>

**H-cca-S-P2-S-ac-PQpYEEIPI-gt-Q-S-Q-tgg-G-NH<sub>2</sub> (63)**



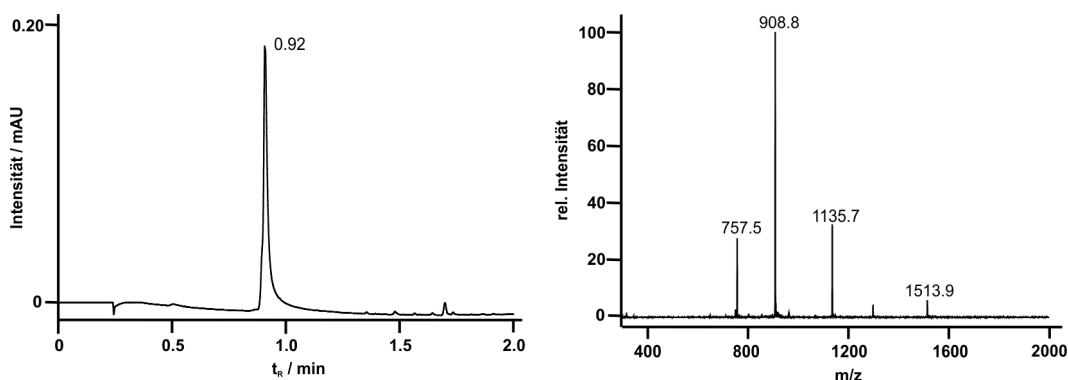
ESI-MS (m/z): ber.: 754.2 [M+7H]<sup>7+</sup>, 879.7 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1055.5 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1319.1 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1758.4 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 754.2 [M+7H]<sup>7+</sup>, 879.7 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1055.4 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1318.9 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1758.1 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-cca-P4-ac-PQpYEEIPI-gt-Q-tgg-G-NH<sub>2</sub> (64)



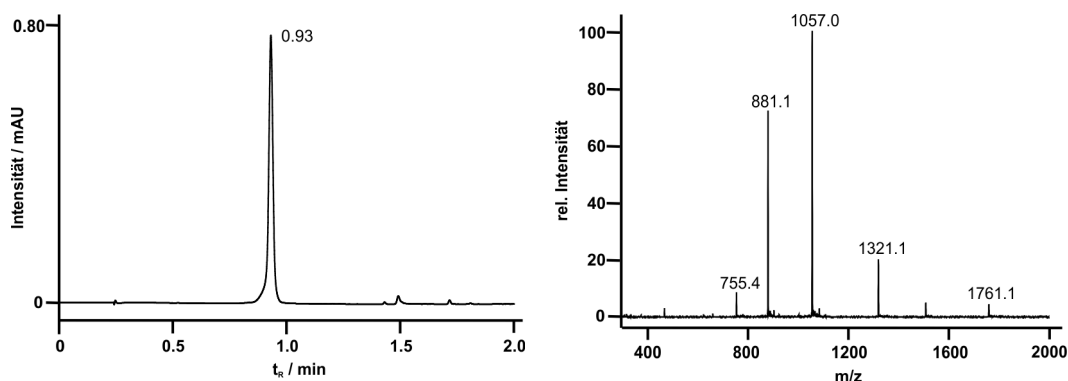
ESI-MS (m/z): ber.: 757.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 908.9 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1135.9 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1514.2 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 757.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 908.8 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1135.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1514.0 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-acc-P4-ca-PQpYEEIPI-tg-Q-ggt-G-NH<sub>2</sub> (65)



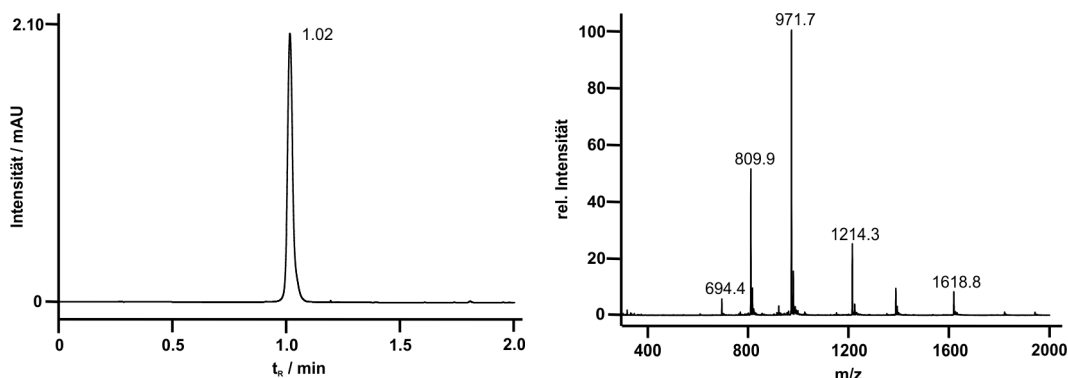
ESI-MS (m/z): ber.: 757.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 908.9 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1135.9 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1514.2 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 757.5 [M+6H]<sup>6+</sup>, 908.8 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1135.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1513.9 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-cca-P2-S-P2-ac-PQpYEEIPI-gt-S-Q-S-tgg-G-NH<sub>2</sub> (66)



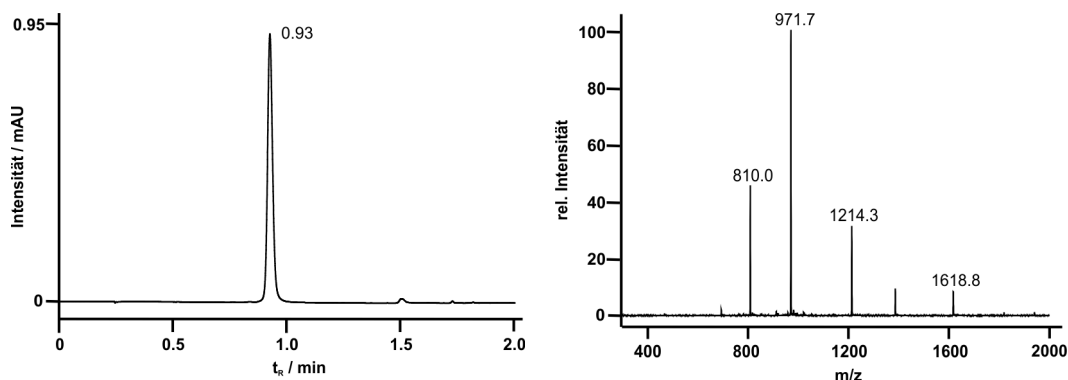
ESI-MS (m/z): ber.: 755.3 [M+7H]<sup>7+</sup>, 881.1 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1057.1 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1321.1 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1761.1 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 755.4 [M+7H]<sup>7+</sup>, 881.1 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1057.0 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1321.1 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1761.1 [M+3H]<sup>3+</sup>

**H-cca-P2-P2-ac-PQpYEEIPI-gt-Q-tgg-G-NH<sub>2</sub> (67)**



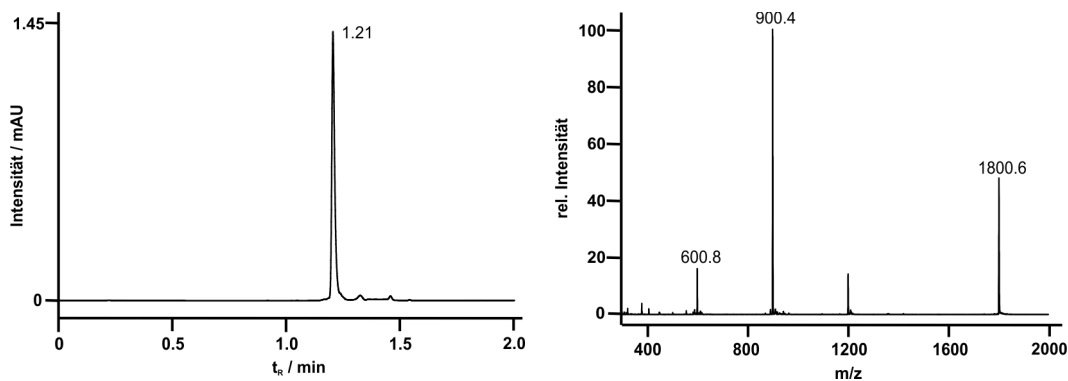
ESI-MS (m/z): ber.: 694.4 [M+7H]<sup>7+</sup>, 810.0 [M+6H]<sup>6+</sup>, 971.8 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1214.5 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1618.9 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 694.4 [M+7H]<sup>7+</sup>, 809.9 [M+6H]<sup>6+</sup>, 971.7 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1214.3 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1618.8 [M+3H]<sup>3+</sup>

**H-ca-P2-P2-acc-PQpYEEIPI-ggt-Q-tg-G-NH<sub>2</sub> (68)**



ESI-MS (m/z): ber.: 810.1 [M+6H]<sup>6+</sup>, 971.8 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1214.5 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1618.9 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 810.0 [M+6H]<sup>6+</sup>, 971.7 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1214.3 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1618.8 [M+3H]<sup>3+</sup>

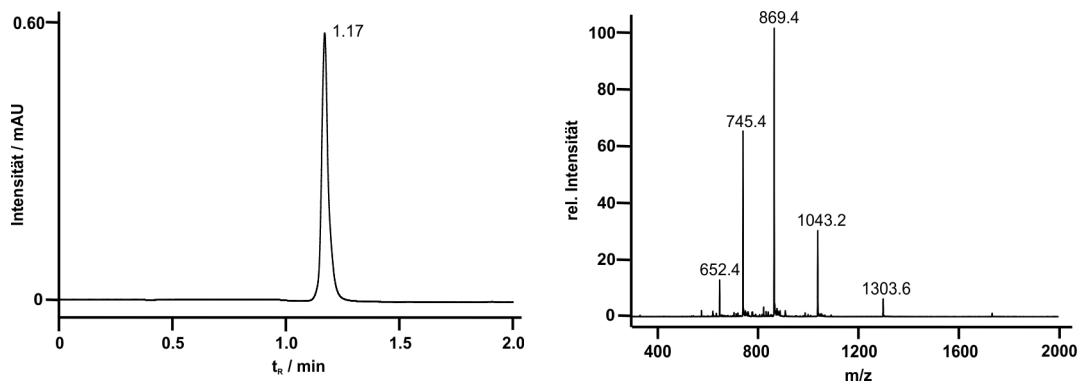
**H-K(C2Pyr)-PQpYEEIPI-K(C1Anthr)-NH<sub>2</sub> (69)**



ESI-MS (m/z): ber.: 601.0 [M+3H]<sup>3+</sup>, 901.0 [M+2H]<sup>2+</sup>, 1801.0 [M+H]<sup>+</sup>  
 gef.: 600.8 [M+3H]<sup>3+</sup>, 900.4 [M+2H]<sup>2+</sup>, 1800.6 [M+H]<sup>+</sup>

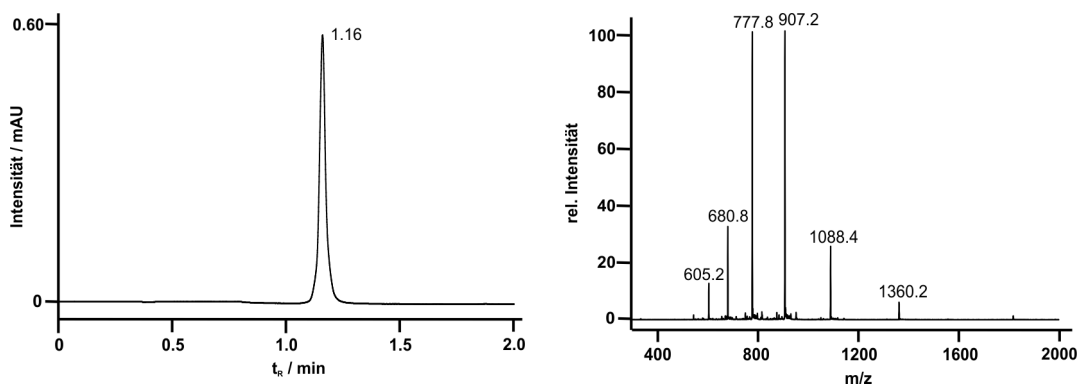
### A.1.4 Verbindungen aus Kapitel 4.4.5

#### H-*cca*-P2-S-P2-*ac*-RPLALWRS-*gt*-S-Q-S-*tgg*-G-NH<sub>2</sub> (70)



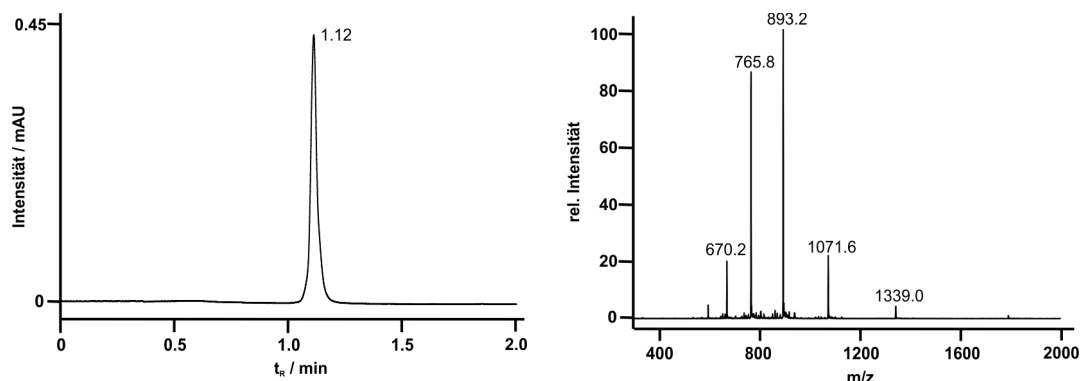
ESI-MS (m/z): ber.: 652.3 [M+8H]<sup>8+</sup>, 745.4 [M+7H]<sup>7+</sup>, 869.4 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1043.1 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1303.6 [M+4H]<sup>4+</sup>  
 gef.: 652.4 [M+8H]<sup>8+</sup>, 745.4 [M+7H]<sup>7+</sup>, 869.4 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1043.2 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1303.6 [M+4H]<sup>4+</sup>

#### H-*cca*-P2-S-P2-*ac*-Ahex-RPLALWRS-Ahex-*gt*-S-Q-S-*tgg*-G-NH<sub>2</sub> (71)

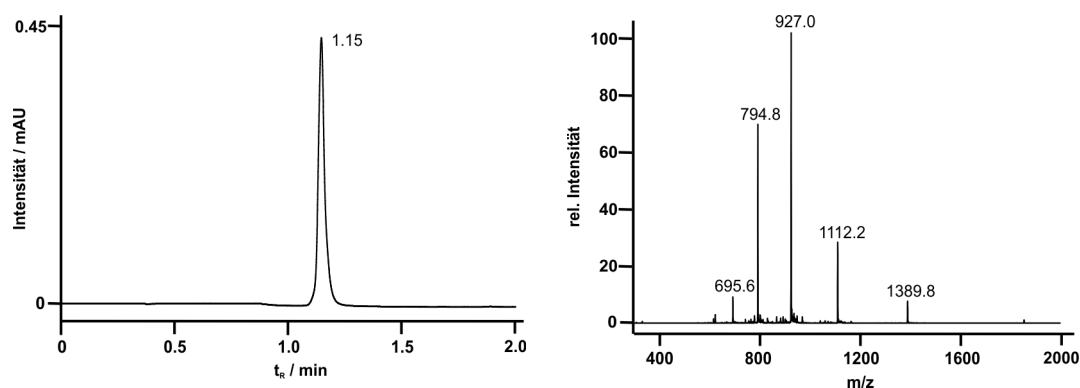


ESI-MS (m/z): ber.: 605.1 [M+9H]<sup>9+</sup>, 680.6 [M+8H]<sup>8+</sup>, 777.7 [M+7H]<sup>7+</sup>, 907.1 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1088.4 [M+5H]<sup>5+</sup>,  
 1360.2 [M+4H]<sup>4+</sup>  
 gef.: 605.2 [M+9H]<sup>9+</sup>, 680.8 [M+8H]<sup>8+</sup>, 777.8 [M+7H]<sup>7+</sup>, 907.2 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1088.4 [M+5H]<sup>5+</sup>,  
 1360.2 [M+4H]<sup>4+</sup>

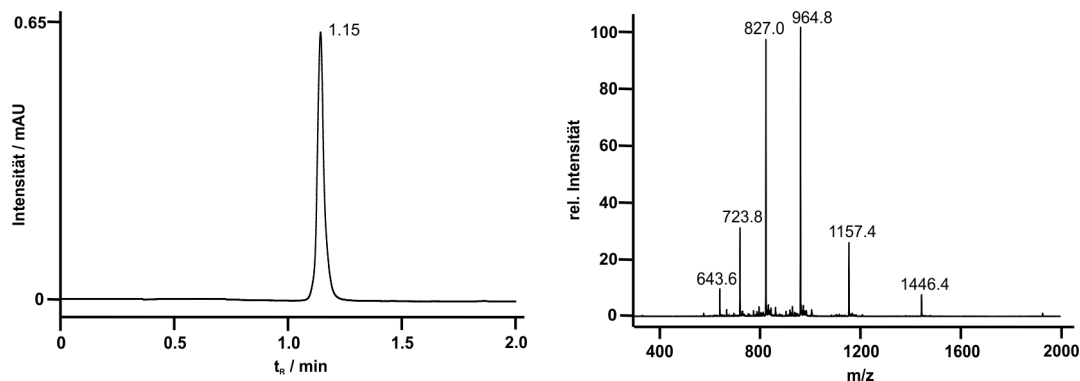
**H-cca-P2-S-P2-ac- $\beta$ A-RPLALWRS- $\beta$ A-gt-S-Q-S-tgg-G-NH<sub>2</sub> (72)**



**H-DDD-cca-P2-S-P2-ac-RPLALWRS-gt-S-Q-S-tgg-G-NH<sub>2</sub> (73)**

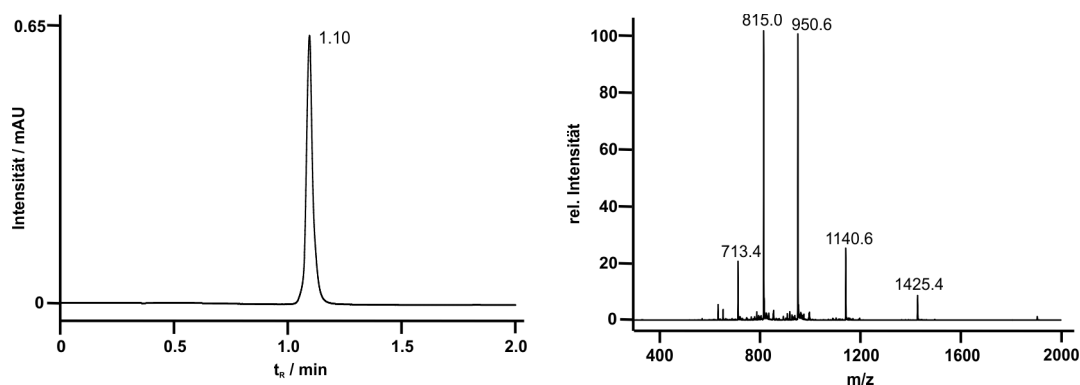


**H-DDD-cca-P2-S-P2-ac-Ahex-RPLALWRS-Ahex-gt-S-Q-S-tgg-G-NH<sub>2</sub> (74)**



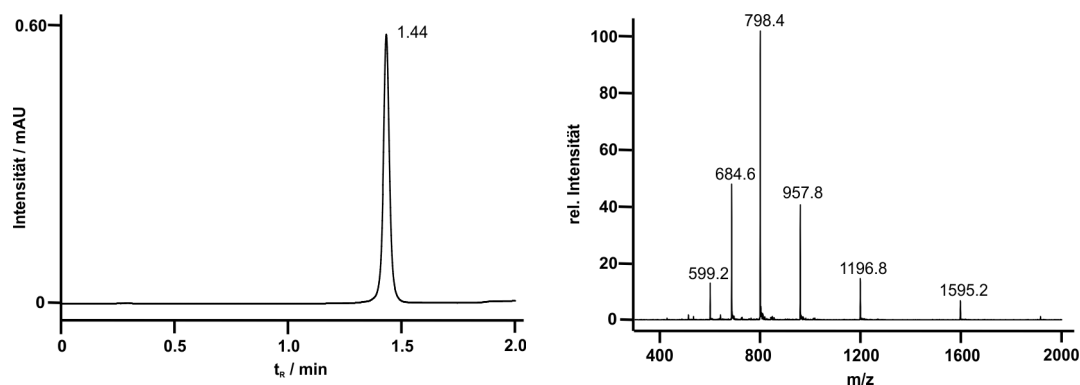


### H-DDD-cca-P2-S-P2-ac- $\beta$ A-RPLALWRS- $\beta$ A-gt-S-Q-S-tgg-G-NH<sub>2</sub> (75)



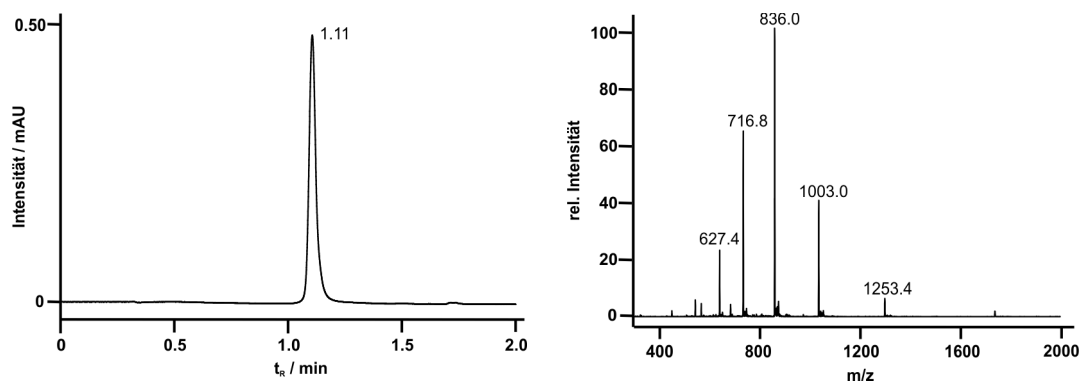
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 713.2 [M+8H]<sup>8+</sup>, 815.0 [M+7H]<sup>7+</sup>, 950.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1140.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1425.5 [M+4H]<sup>4+</sup>  
 gef.: 713.4 [M+8H]<sup>8+</sup>, 815.0 [M+7H]<sup>7+</sup>, 950.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1140.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1425.4 [M+4H]<sup>4+</sup>

### H-cca-P2-P2-ac-RPLALWRS-gt-Q-tgg-G-NH<sub>2</sub> (76)



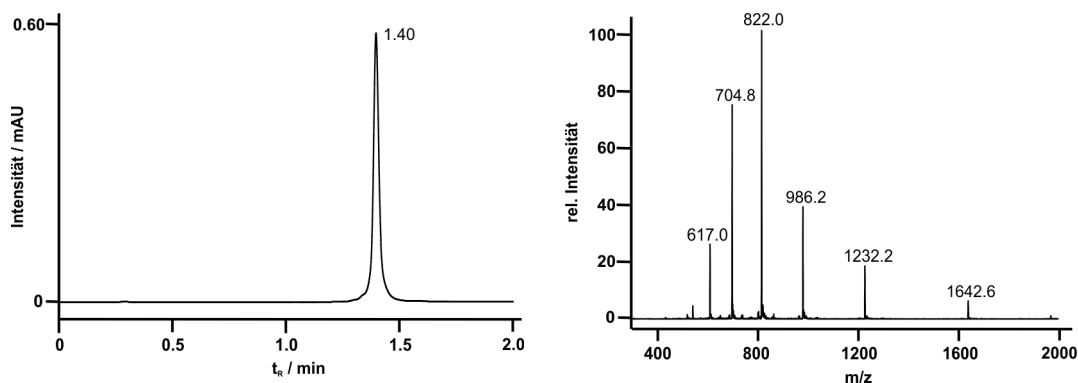
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 599.0 [M+8H]<sup>8+</sup>, 684.4 [M+7H]<sup>7+</sup>, 798.3 [M+6H]<sup>6+</sup>, 957.8 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1197.0 [M+4H]<sup>4+</sup>,  
 1595.7 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 599.2 [M+8H]<sup>8+</sup>, 684.6 [M+7H]<sup>7+</sup>, 798.4 [M+6H]<sup>6+</sup>, 957.8 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1196.8 [M+4H]<sup>4+</sup>,  
 1595.2 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-cca-P2-P2-ac-Ahex-RPLALWRS-Ahex-gt-Q-tgg-G-NH<sub>2</sub> (77)



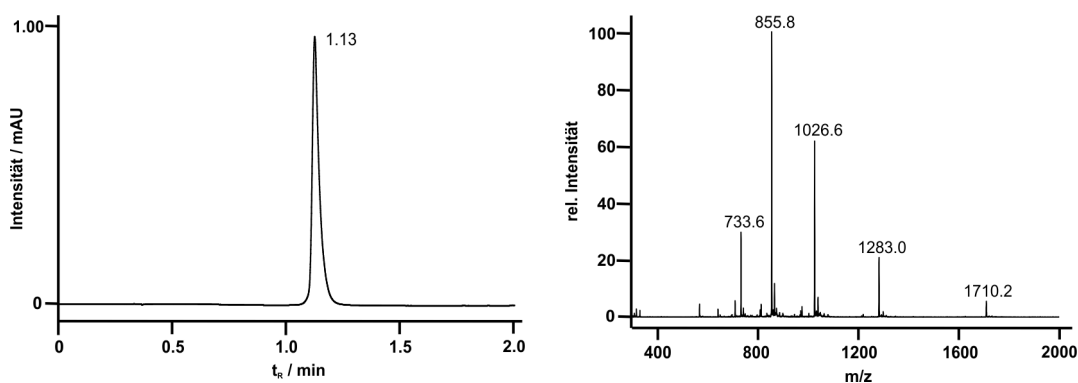
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 627.3 [M+8H]<sup>8+</sup>, 716.8 [M+7H]<sup>7+</sup>, 836.1 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1003.1 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1253.6 [M+4H]<sup>4+</sup>  
 gef.: 627.4 [M+8H]<sup>8+</sup>, 716.8 [M+7H]<sup>7+</sup>, 836.0 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1003.0 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1253.4 [M+4H]<sup>4+</sup>

**H-*cca*-P2-P2-*ac*-βA-RPLALWRS-βA-*gt*-Q-*tgg*-G-NH<sub>2</sub> (78)**



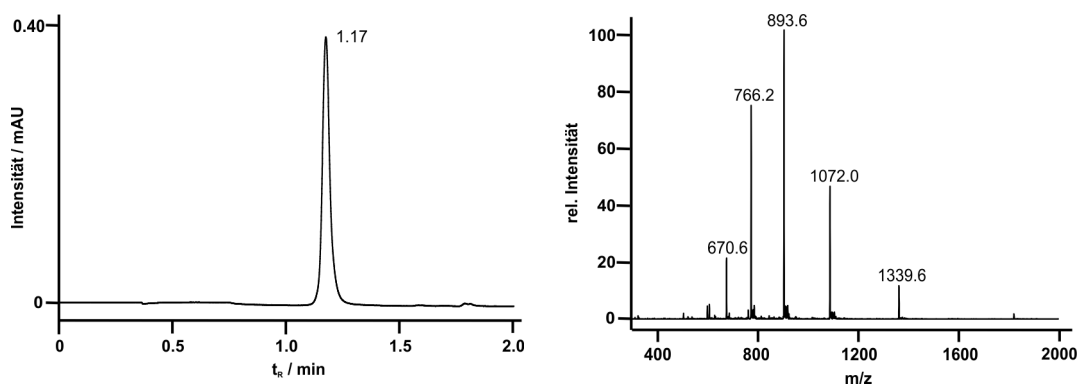
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 616.8 [M+8H]<sup>8+</sup>, 704.7 [M+7H]<sup>7+</sup>, 822.0 [M+6H]<sup>6+</sup>, 986.2 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1232.5 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1643.0 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 617.0 [M+8H]<sup>8+</sup>, 704.8 [M+7H]<sup>7+</sup>, 822.0 [M+6H]<sup>6+</sup>, 986.2 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1232.2 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1642.6 [M+3H]<sup>3+</sup>

**H-DDD-*cca*-P2-P2-*ac*-RPLALWRS-*gt*-Q-*tgg*-G-NH<sub>2</sub> (79)**



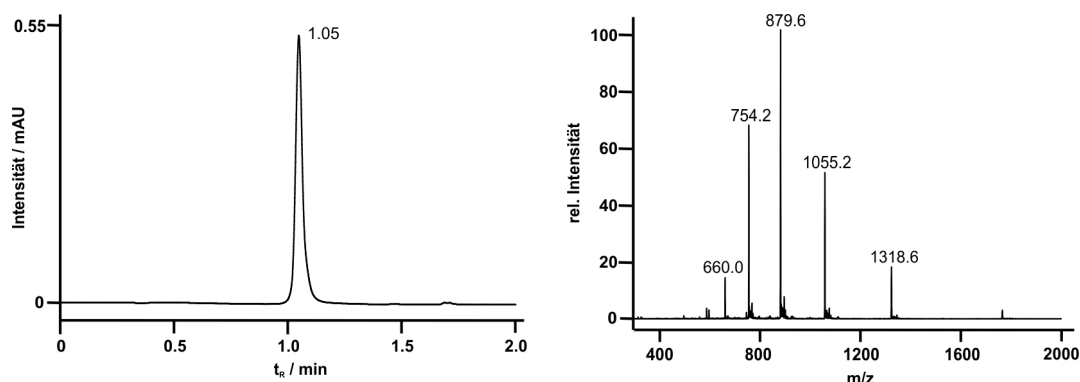
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 733.8 [M+7H]<sup>7+</sup>, 855.9 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1026.8 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1283.3 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1710.7 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 733.6 [M+7H]<sup>7+</sup>, 855.8 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1026.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1283.0 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1710.2 [M+3H]<sup>3+</sup>

**H-DDD-*cca*-P2-P2-*ac*-Ahex-RPLALWRS-Ahex-*gt*-Q-*tgg*-G-NH<sub>2</sub> (80)**



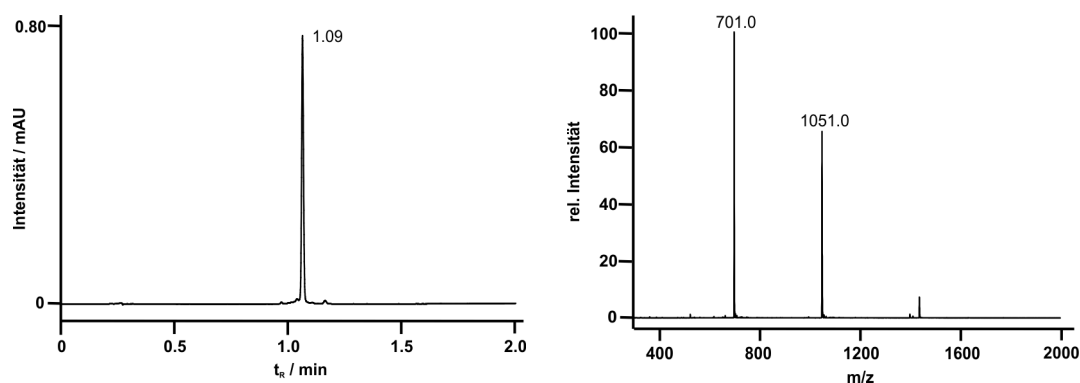
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 670.4 [M+8H]<sup>8+</sup>, 766.1 [M+7H]<sup>7+</sup>, 893.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1072.1 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1339.9 [M+4H]<sup>4+</sup>  
 gef.: 670.6 [M+8H]<sup>8+</sup>, 766.2 [M+7H]<sup>7+</sup>, 893.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1072.0 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1339.6 [M+4H]<sup>4+</sup>

### H-DDD-*cca*-P2-P2-*ac*- $\beta$ A-RPLALWRS- $\beta$ A-*gt*-Q-*tgg*-G-NH<sub>2</sub> (81)



ESI-MS (m/z): ber.: 659.9 [M+8H]<sup>8+</sup>, 754.1 [M+7H]<sup>7+</sup>, 879.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1055.3 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1318.8 [M+4H]<sup>4+</sup>  
 gef.: 660.0 [M+8H]<sup>8+</sup>, 754.2 [M+7H]<sup>7+</sup>, 879.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 1055.2 [M+5H]<sup>5+</sup>, 1318.6 [M+4H]<sup>4+</sup>

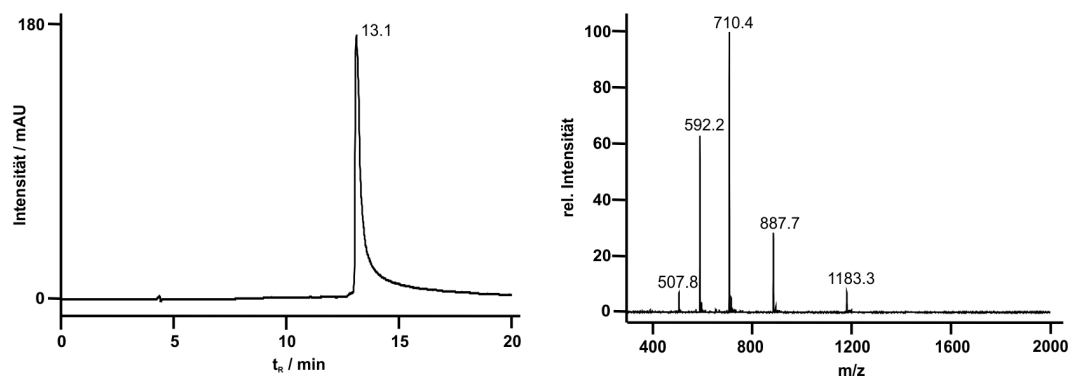
### H-K(C2Pyr)-K(C2Pyr)-RPLALWRS-K(C1Anthr)-NH<sub>2</sub> (82)



ESI-MS (m/z): ber.: 701.2 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1051.2 [M+2H]<sup>2+</sup>  
 gef.: 701.0 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1051.0 [M+2H]<sup>2+</sup>

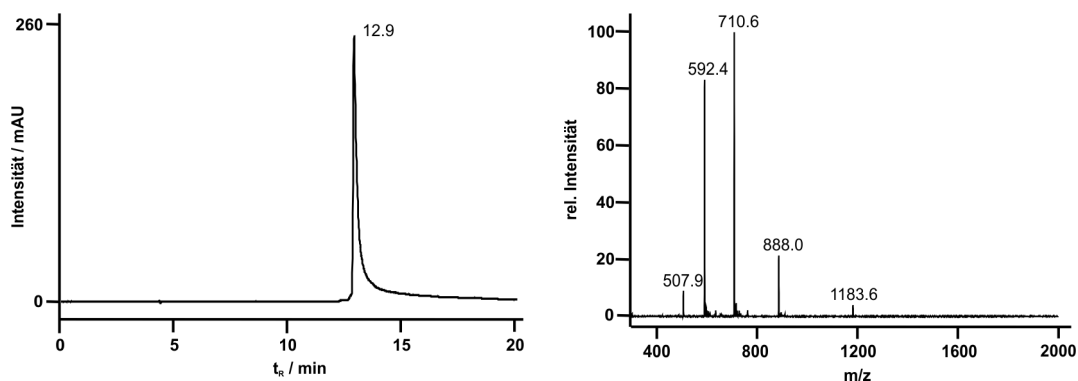
## A.1.5 Verbindungen aus Kapitel 4.5

### H-K-*tttg*-PQpYEEIPI-*caaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (13)



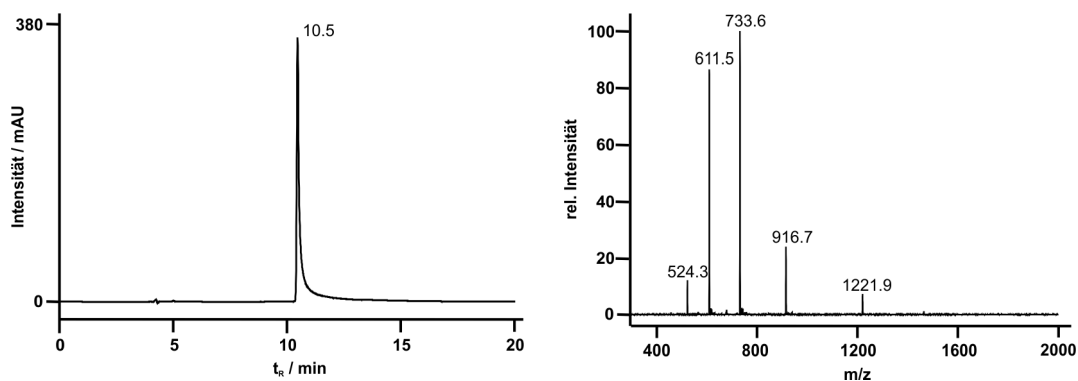
ESI-MS (m/z): ber.: 507.8 [M+7H]<sup>7+</sup>, 592.3 [M+6H]<sup>6+</sup>, 710.5 [M+5H]<sup>5+</sup>, 887.9 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1183.5 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 507.8 [M+7H]<sup>7+</sup>, 592.2 [M+6H]<sup>6+</sup>, 710.4 [M+5H]<sup>5+</sup>, 887.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1183.3 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-K-*gttg*-PQpYEEIPI-*caac*-K-G-NH<sub>2</sub> (14)



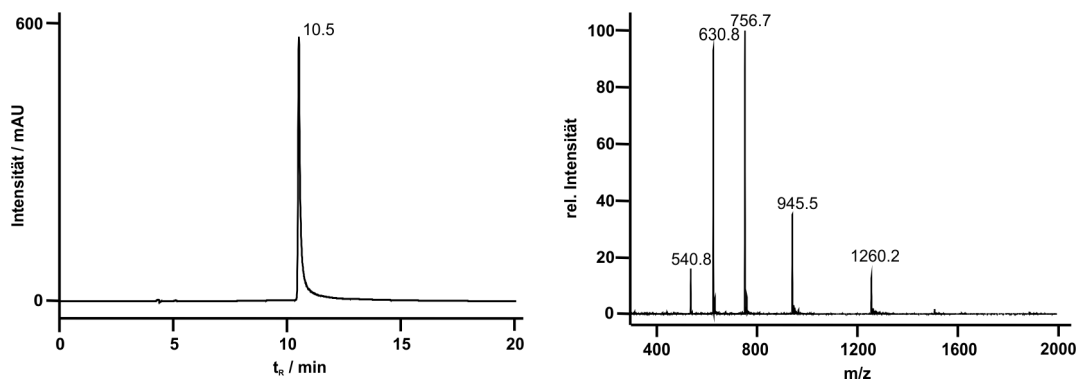
ESI-MS (m/z): ber.: 507.9 [M+7H]<sup>7+</sup>, 592.4 [M+6H]<sup>6+</sup>, 710.7 [M+5H]<sup>5+</sup>, 888.1 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1183.9 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 507.9 [M+7H]<sup>7+</sup>, 592.4 [M+6H]<sup>6+</sup>, 710.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 888.0 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1183.6 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-D-K-*gttg*-PQpYEEIPI-*caac*-K-G-NH<sub>2</sub> (15)



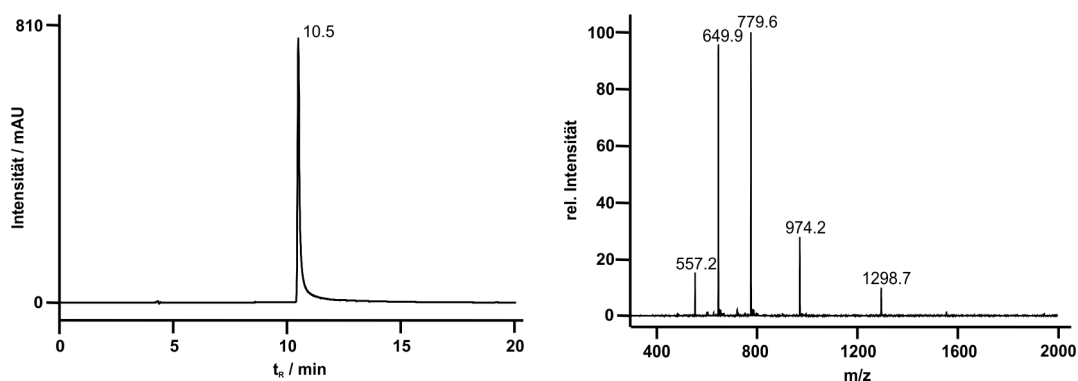
ESI-MS (m/z): ber.: 524.4 [M+7H]<sup>7+</sup>, 611.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 733.7 [M+5H]<sup>5+</sup>, 916.9 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1222.2 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 524.3 [M+7H]<sup>7+</sup>, 611.5 [M+6H]<sup>6+</sup>, 733.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 916.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1221.9 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-DD-K-*gttg*-PQpYEEIPI-*caac*-K-G-NH<sub>2</sub> (16)



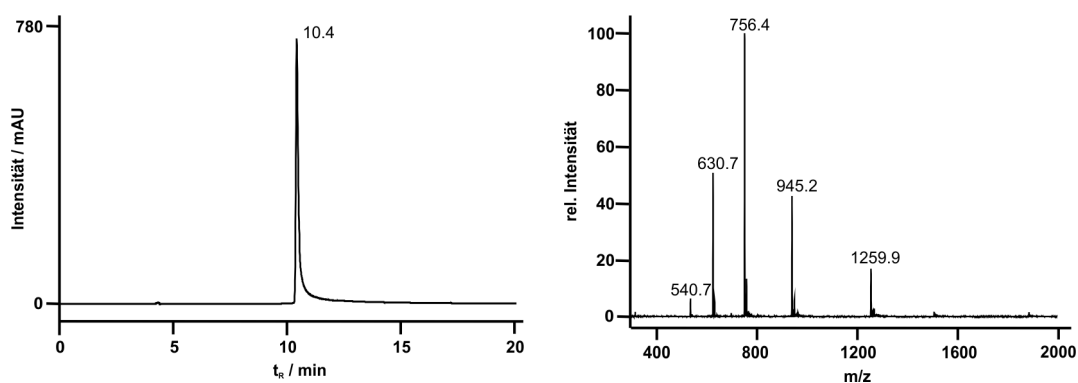
ESI-MS (m/z): ber.: 540.8 [M+7H]<sup>7+</sup>, 630.8 [M+6H]<sup>6+</sup>, 756.8 [M+5H]<sup>5+</sup>, 945.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1260.6 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 540.8 [M+7H]<sup>7+</sup>, 630.8 [M+6H]<sup>6+</sup>, 756.7 [M+5H]<sup>5+</sup>, 945.5 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1260.2 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-DDD-K-*gttg*-PQpYEEIPI-*caac*-K-G-NH<sub>2</sub> (17)



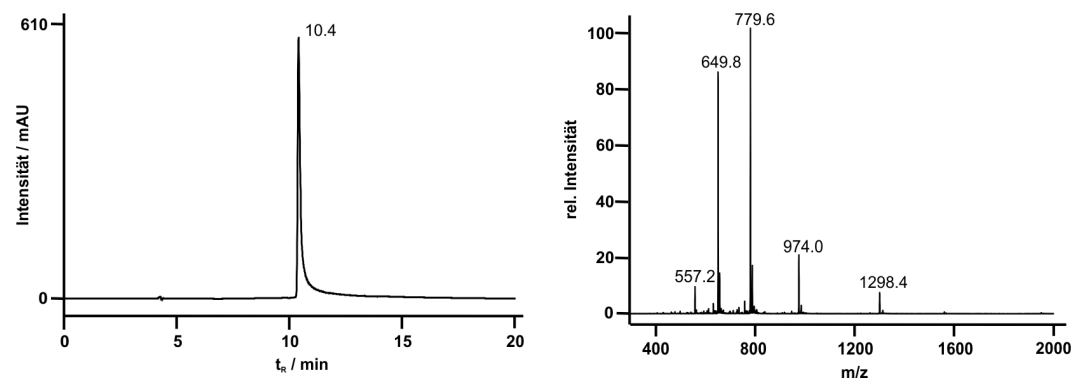
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 557.3 [M+7H]<sup>7+</sup>, 650.0 [M+6H]<sup>6+</sup>, 779.8 [M+5H]<sup>5+</sup>, 974.5 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1298.9 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 557.2 [M+7H]<sup>7+</sup>, 649.9 [M+6H]<sup>6+</sup>, 779.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 974.2 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1298.7 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-DD-K-*tttg*-PQpYEEIPI-*caaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (18)



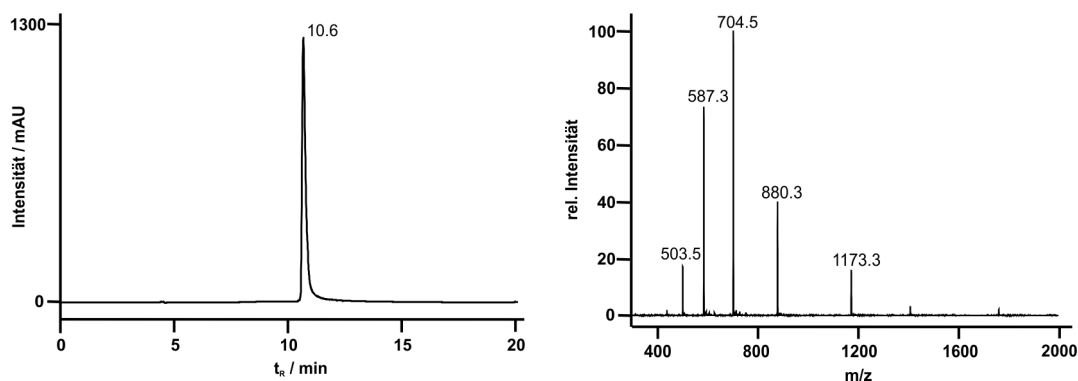
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 540.7 [M+7H]<sup>7+</sup>, 630.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 756.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 945.4 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1260.3 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 540.7 [M+7H]<sup>7+</sup>, 630.7 [M+6H]<sup>6+</sup>, 756.4 [M+5H]<sup>5+</sup>, 945.2 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1259.9 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-DDD-K-*tttg*-PQpYEEIPI-*caaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (19)



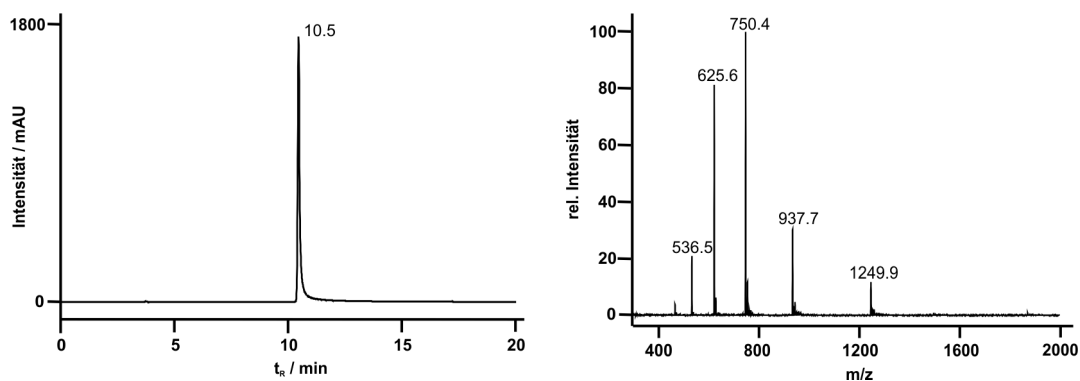
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 557.1 [M+7H]<sup>7+</sup>, 649.8 [M+6H]<sup>6+</sup>, 779.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 974.2 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1298.6 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 557.2 [M+7H]<sup>7+</sup>, 649.8 [M+6H]<sup>6+</sup>, 779.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 974.0 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1298.4 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-K-*gcta*-PQpYEEIPI-*ccaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (20)



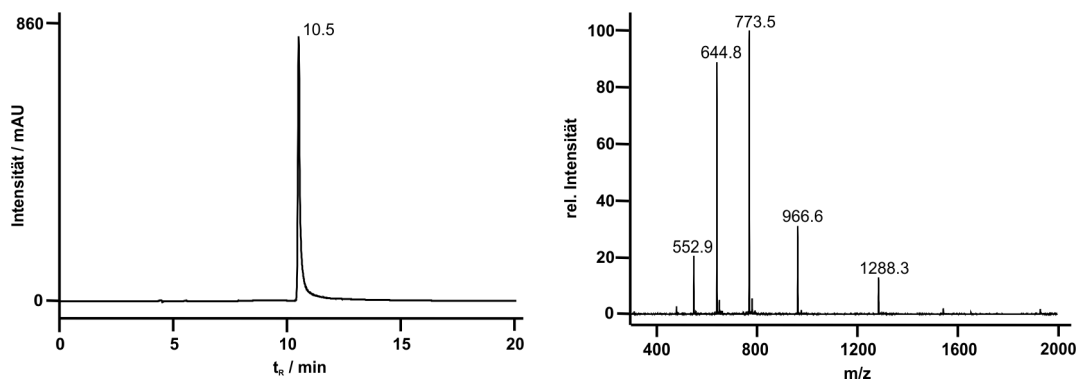
ESI-MS (m/z): ber.: 503.5 [M+7H]<sup>7+</sup>, 587.3 [M+6H]<sup>6+</sup>, 704.5 [M+5H]<sup>5+</sup>, 880.4 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1173.5 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 503.5 [M+7H]<sup>7+</sup>, 587.3 [M+6H]<sup>6+</sup>, 704.5 [M+5H]<sup>5+</sup>, 880.3 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1173.3 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-DD-K-*gcta*-PQpYEEIPI-*ccaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (21)



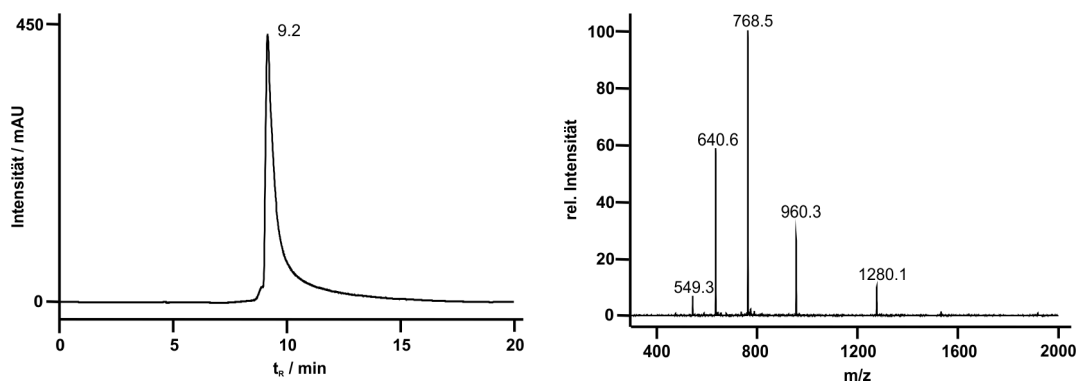
ESI-MS (m/z): ber.: 536.4 [M+7H]<sup>7+</sup>, 625.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 750.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 937.9 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1250.2 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 536.5 [M+7H]<sup>7+</sup>, 625.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 750.4 [M+5H]<sup>5+</sup>, 937.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1249.9 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-DDD-K-*gcta*-PQpYEEIPI-*ccaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (22)



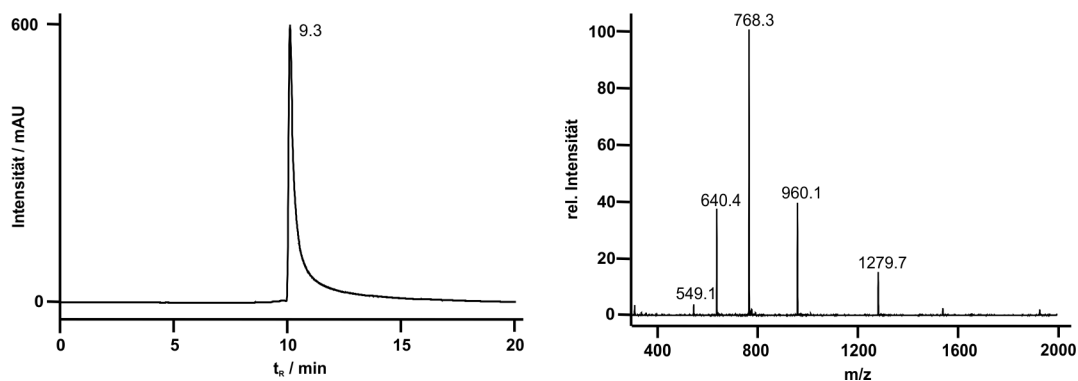
ESI-MS (m/z): ber.: 552.8 [M+7H]<sup>7+</sup>, 644.8 [M+6H]<sup>6+</sup>, 773.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 966.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1288.6 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 552.9 [M+7H]<sup>7+</sup>, 644.8 [M+6H]<sup>6+</sup>, 773.5 [M+5H]<sup>5+</sup>, 966.6 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1288.3 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-DD-K-*gttg*-TEGQpYQPQP-*caac*-K-G-NH<sub>2</sub> (23)



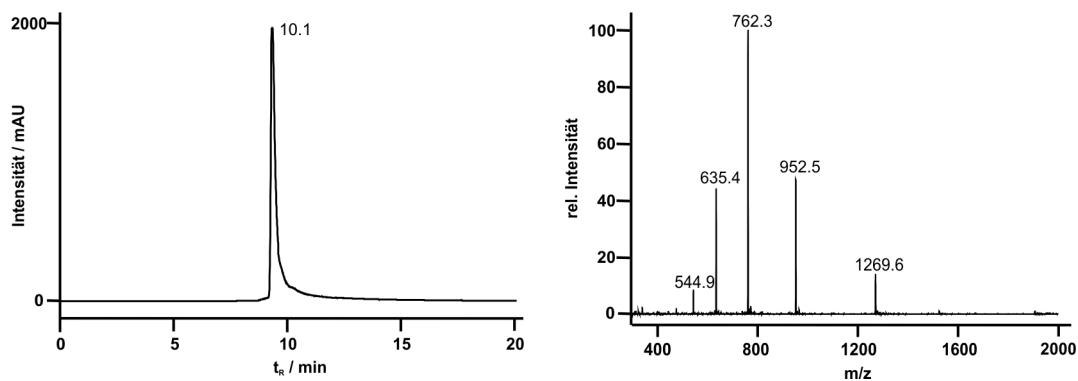
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 549.3 [M+7H]<sup>7+</sup>, 640.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 768.6 [M+5H]<sup>5+</sup>, 960.4 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1280.2 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 549.3 [M+7H]<sup>7+</sup>, 640.6 [M+6H]<sup>6+</sup>, 768.5 [M+5H]<sup>5+</sup>, 960.3 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1280.1 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-DD-K-*tttg*-TEGQpYQPQP-*caaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (24)



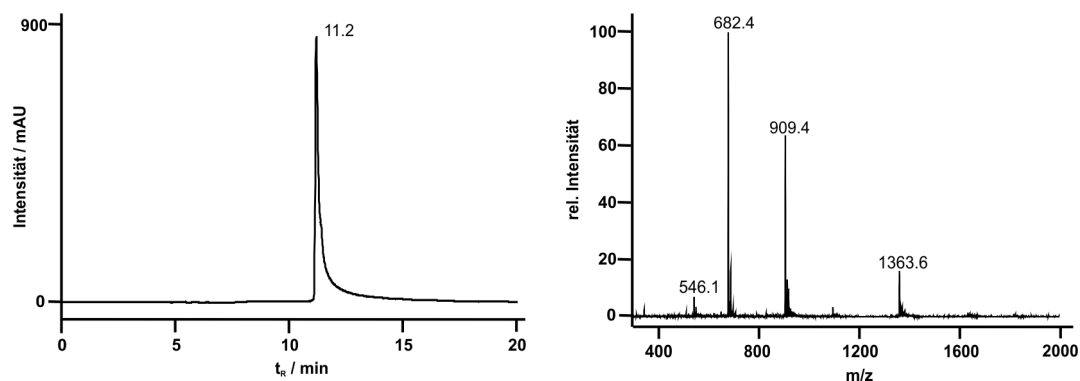
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 549.1 [M+7H]<sup>7+</sup>, 640.5 [M+6H]<sup>6+</sup>, 768.4 [M+5H]<sup>5+</sup>, 960.2 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1279.9 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 549.1 [M+7H]<sup>7+</sup>, 640.4 [M+6H]<sup>6+</sup>, 768.3 [M+5H]<sup>5+</sup>, 960.1 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1279.7 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-DD-K-*gcta*-TEGQpYQPQP-*caa*-K-G-NH<sub>2</sub> (25)



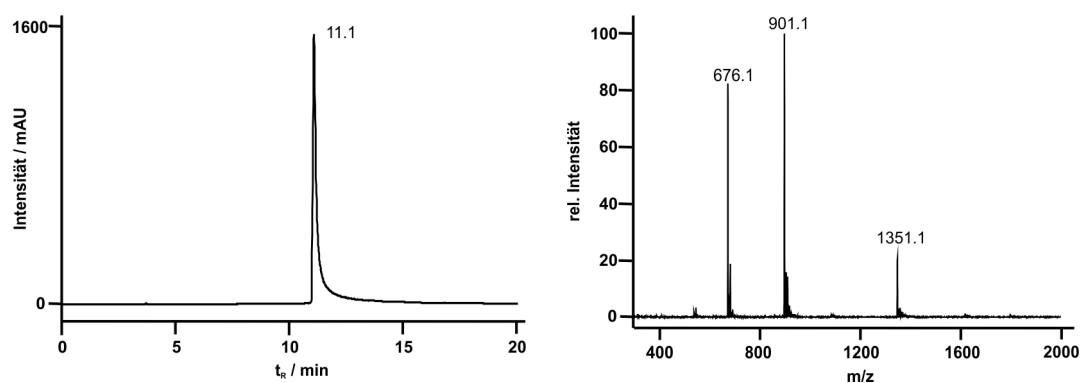
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 544.8 [M+7H]<sup>7+</sup>, 635.5 [M+6H]<sup>6+</sup>, 762.3 [M+5H]<sup>5+</sup>, 952.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1269.9 [M+3H]<sup>3+</sup>  
 gef.: 544.9 [M+7H]<sup>7+</sup>, 635.4 [M+6H]<sup>6+</sup>, 762.3 [M+5H]<sup>5+</sup>, 952.5 [M+4H]<sup>4+</sup>, 1269.6 [M+3H]<sup>3+</sup>

### H-DD-K-*gttg*-PQpYEEIPI-K-G-NH<sub>2</sub> (26)



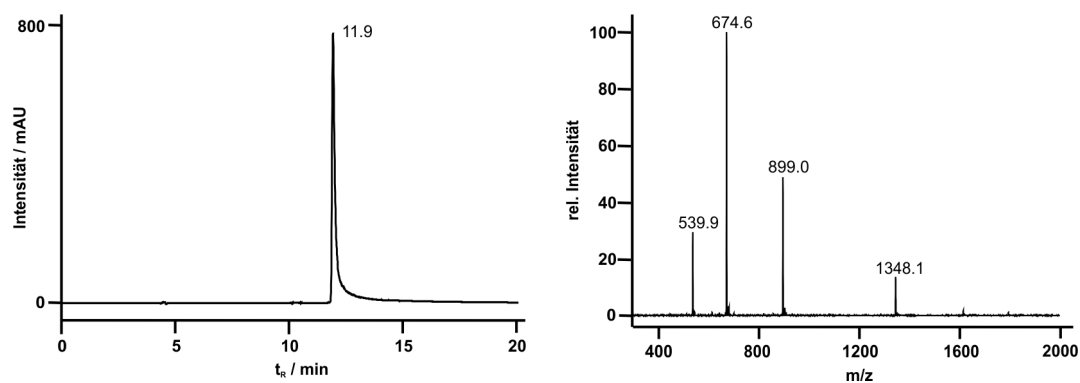
ESI-MS (m/z): ber.: 546.2 [M+5H]<sup>5+</sup>, 682.4 [M+4H]<sup>4+</sup>, 909.6 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1363.9 [M+2H]<sup>2+</sup>  
 gef.: 546.1 [M+5H]<sup>5+</sup>, 682.4 [M+4H]<sup>4+</sup>, 909.4 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1363.6 [M+2H]<sup>2+</sup>

### H-DD-K-*tttg*-PQpYEEIPI-K-G-NH<sub>2</sub> (27)



ESI-MS (m/z): ber.: 676.2 [M+4H]<sup>4+</sup>, 901.2 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1351.4 [M+2H]<sup>2+</sup>  
 gef.: 676.1 [M+4H]<sup>4+</sup>, 901.1 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1351.1 [M+2H]<sup>2+</sup>

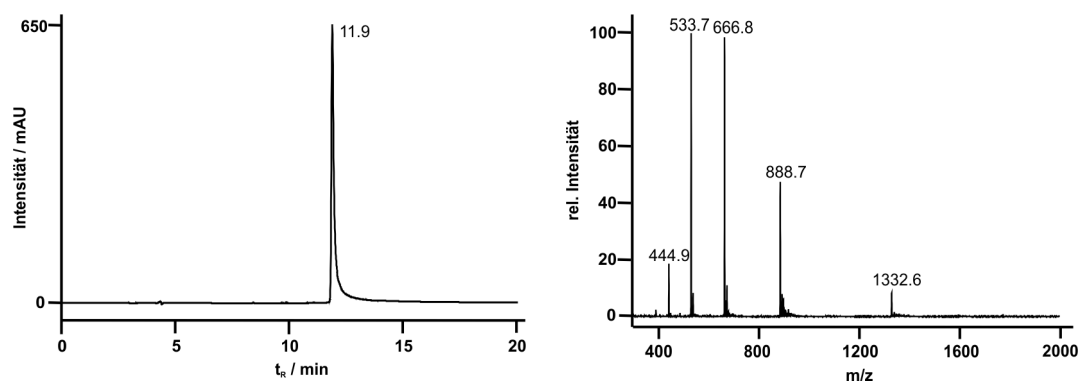
### H-DD-K-*gcta*-PQpYEEIPI-K-G-NH<sub>2</sub> (28)



ESI-MS (m/z): ber.: 539.9 [M+5H]<sup>5+</sup>, 674.7 [M+4H]<sup>4+</sup>, 899.2 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1348.4 [M+2H]<sup>2+</sup>  
 gef.: 539.9 [M+5H]<sup>5+</sup>, 674.6 [M+4H]<sup>4+</sup>, 899.0 [M+3H]<sup>3+</sup>, 1348.1 [M+2H]<sup>2+</sup>

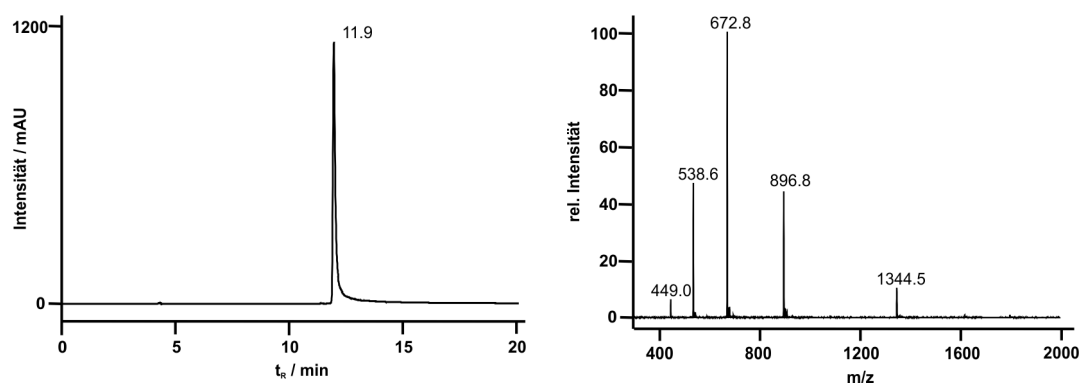


### H-DD-K-PQpYEEIPI-*caac*-K-G-NH<sub>2</sub> (29)



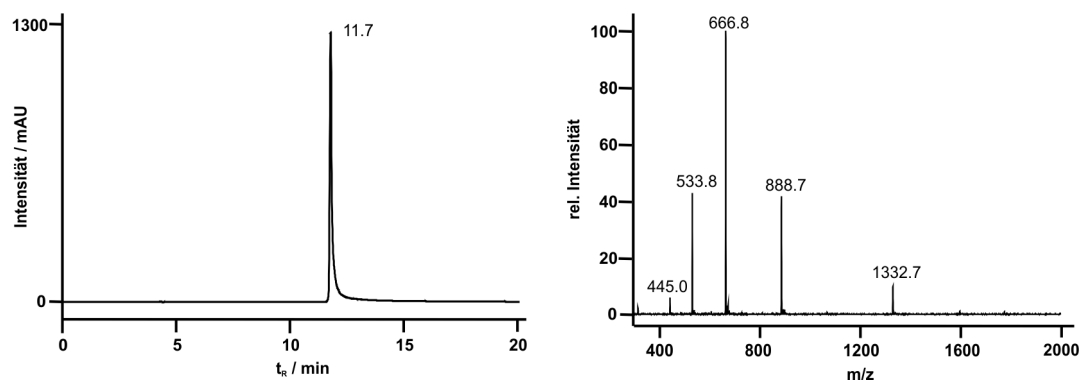
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 445.0  $[M+6H]^{6+}$ , 533.7  $[M+5H]^{5+}$ , 666.9  $[M+4H]^{4+}$ , 888.9  $[M+3H]^{3+}$ , 1332.8  $[M+2H]^{2+}$   
 gef.: 449.9  $[M+6H]^{6+}$ , 533.7  $[M+5H]^{5+}$ , 666.8  $[M+4H]^{4+}$ , 888.7  $[M+3H]^{3+}$ , 1332.6  $[M+2H]^{2+}$

### H-DD-K-PQpYEEIPI-*caaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (30)



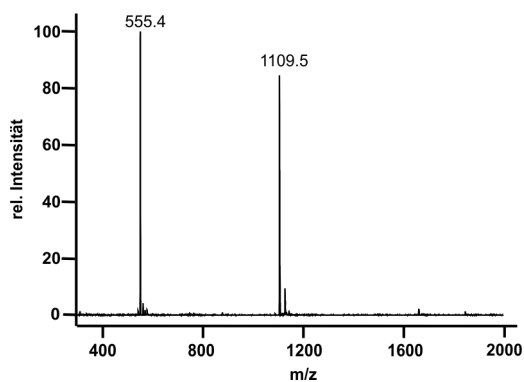
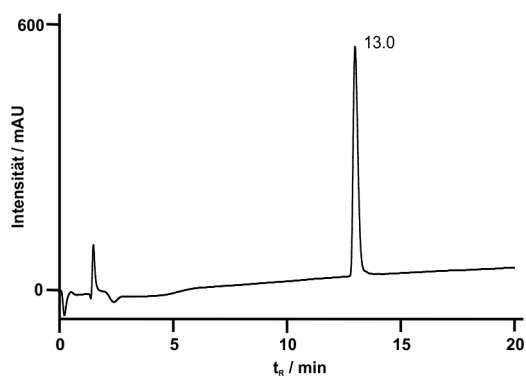
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 449.0  $[M+6H]^{6+}$ , 538.6  $[M+5H]^{5+}$ , 672.9  $[M+4H]^{4+}$ , 896.9  $[M+3H]^{3+}$ , 1344.9  $[M+2H]^{2+}$   
 gef.: 449.0  $[M+6H]^{6+}$ , 538.6  $[M+5H]^{5+}$ , 672.8  $[M+4H]^{4+}$ , 896.8  $[M+3H]^{3+}$ , 1344.5  $[M+2H]^{2+}$

### H-DD-K-PQpYEEIPI-*ccaa*-K-G-NH<sub>2</sub> (31)



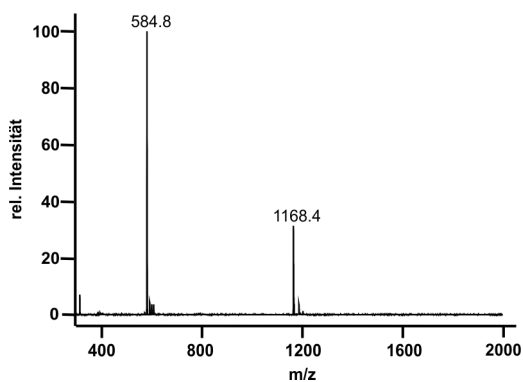
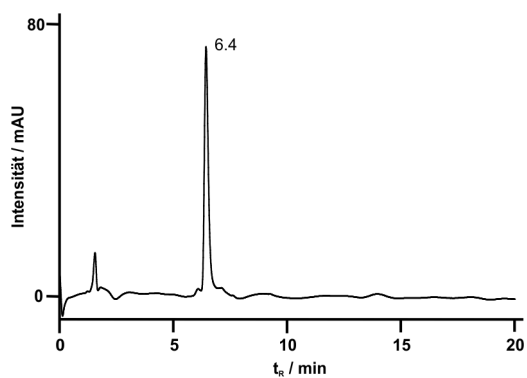
ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 445.0  $[M+6H]^{6+}$ , 533.7  $[M+5H]^{5+}$ , 666.9  $[M+4H]^{4+}$ , 888.9  $[M+3H]^{3+}$ , 1332.8  $[M+2H]^{2+}$   
 gef.: 445.0  $[M+6H]^{6+}$ , 533.8  $[M+5H]^{5+}$ , 666.8  $[M+4H]^{4+}$ , 888.7  $[M+3H]^{3+}$ , 1332.7  $[M+2H]^{2+}$

### Ac-PQpYEEIPI-NH<sub>2</sub> (32)



ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 555.6  $[M+2H]^{2+}$ , 1010.1  $[M+H]^+$   
 gef.: 555.4  $[M+2H]^{2+}$ , 1009.5  $[M+H]^+$

### Ac-TEGQpYQPQP-NH<sub>2</sub> (33)

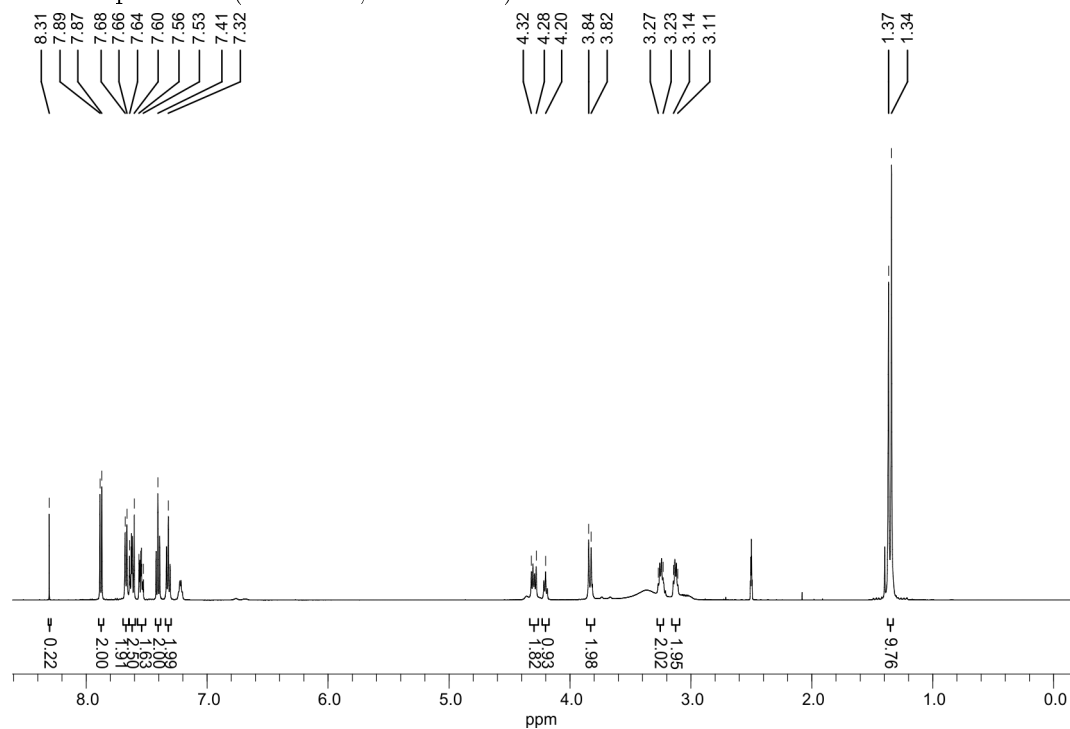


ESI-MS ( $m/z$ ): ber.: 585.1  $[M+2H]^{2+}$ , 1169.1  $[M+H]^+$   
 gef.: 584.8  $[M+2H]^{2+}$ , 1168.4  $[M+H]^+$

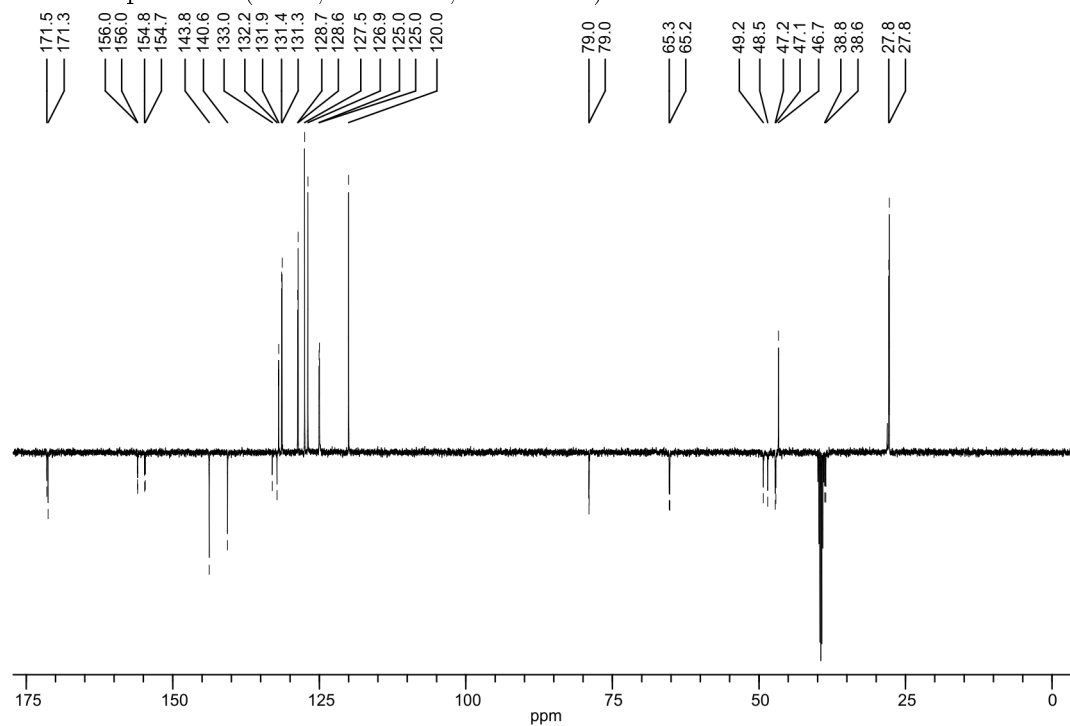
## A.2 NMR-Spektren

### Fmoc-Aeg(Boc)-OH (38)

$^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO- $d_6$ )

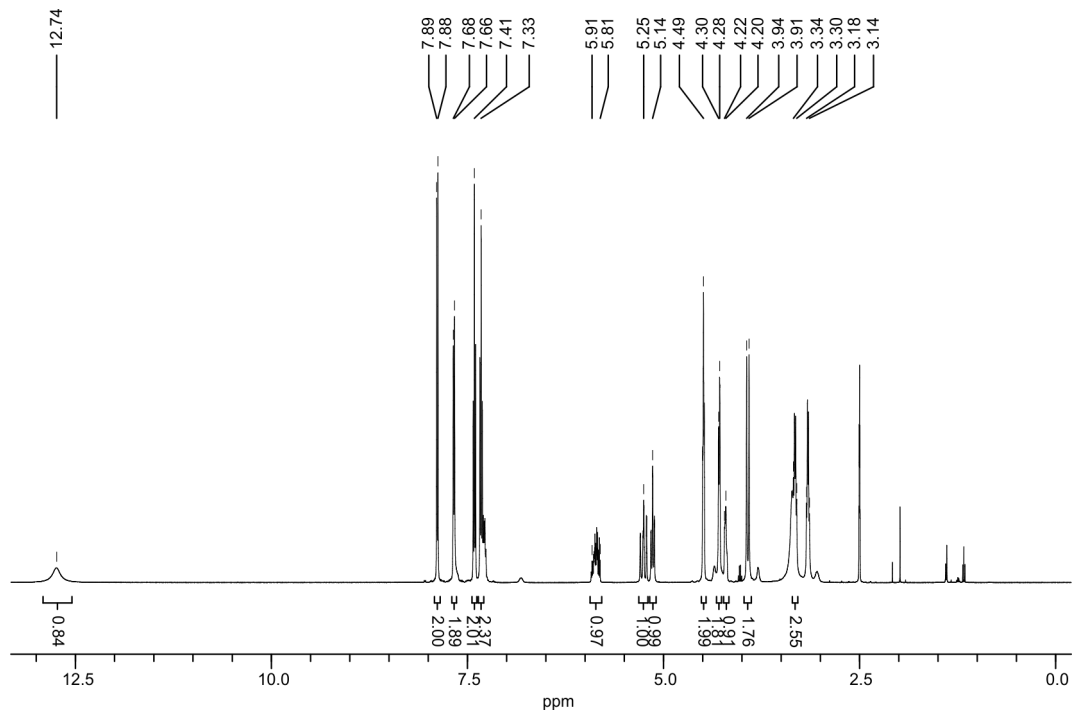


$^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (APT, 125 MHz, DMSO- $d_6$ )

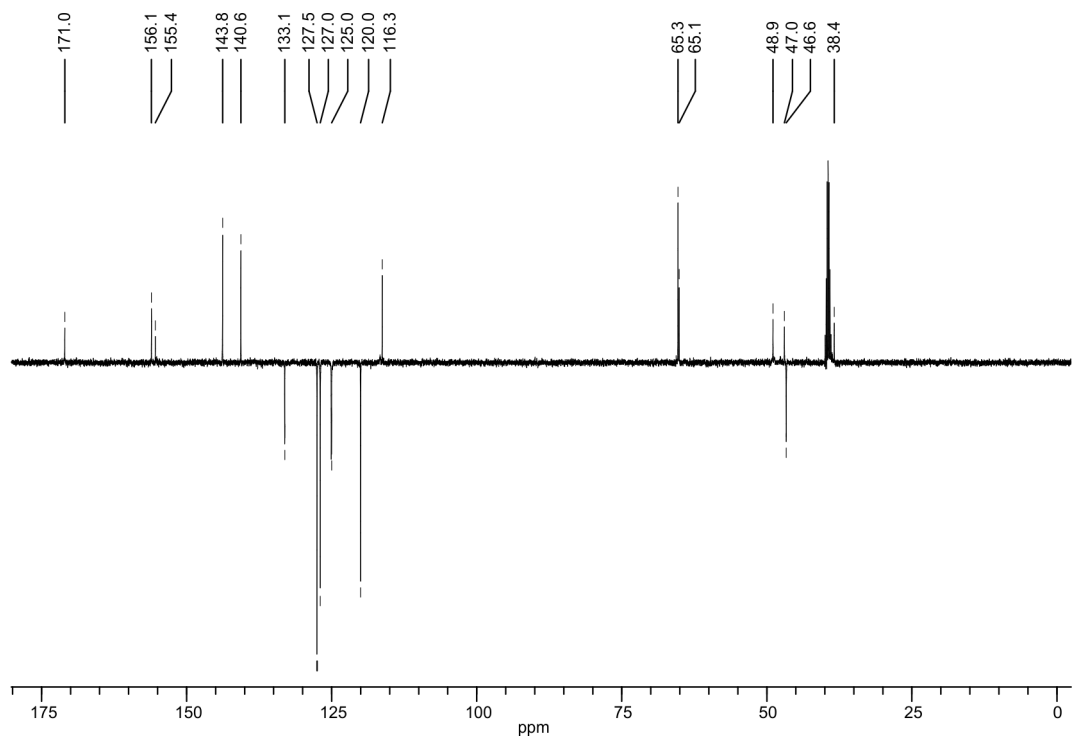


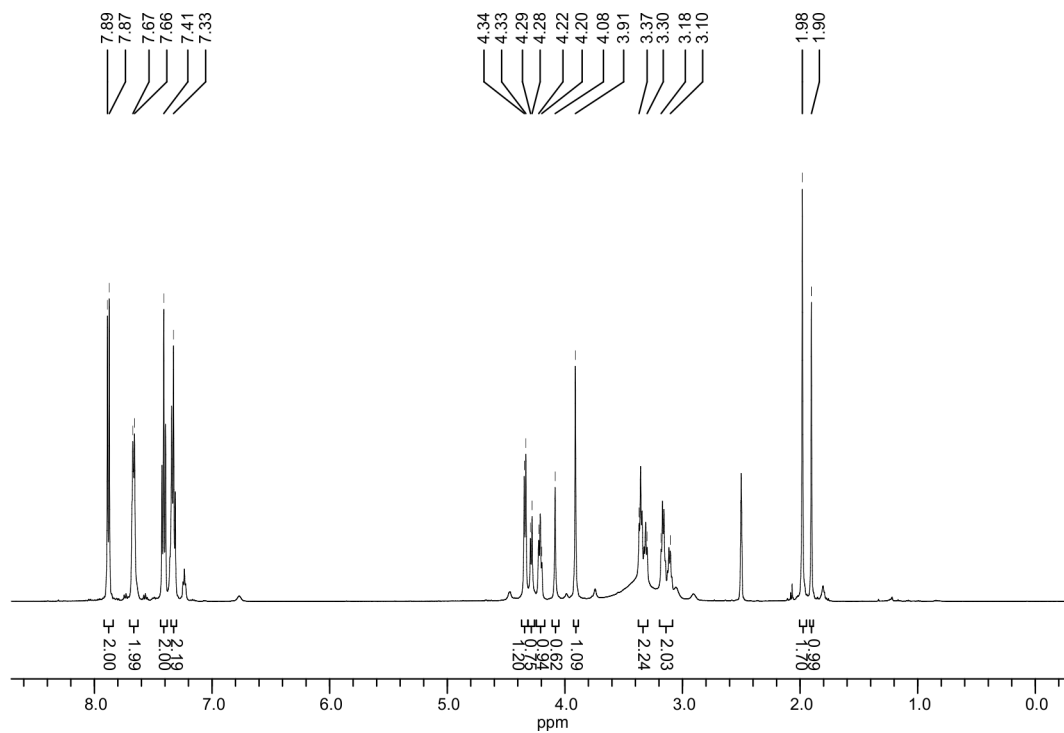
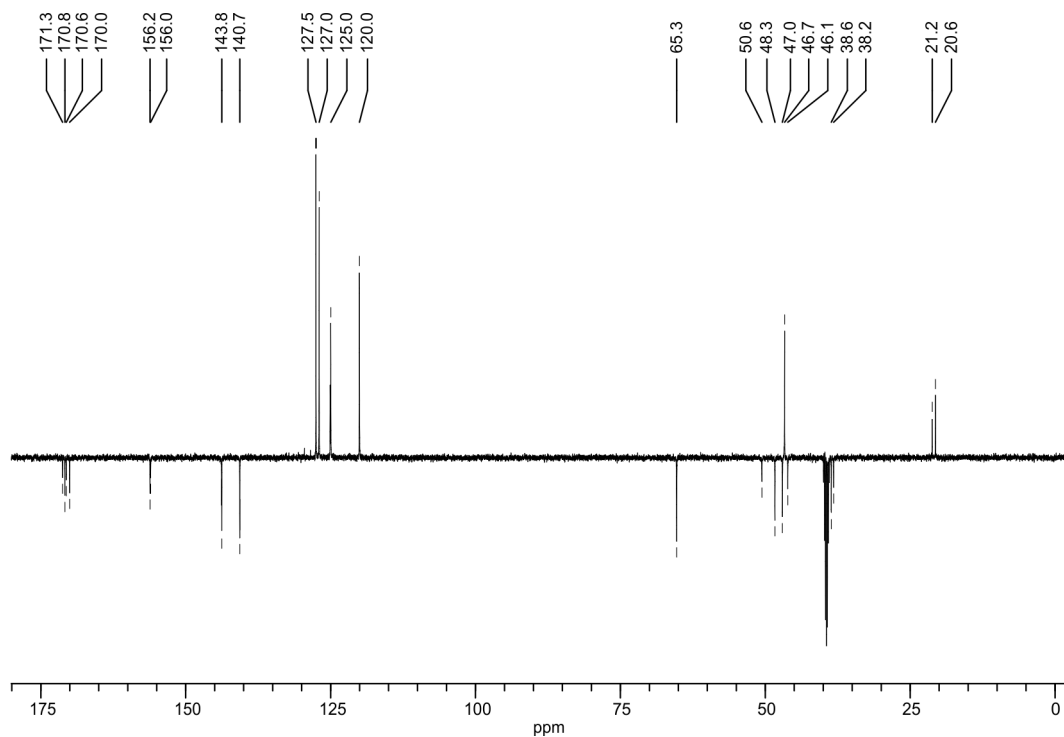
# **Fmoc-Aeg(Alloc)-OH (39)**

<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)



<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (APT, 125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)



**Fmoc-Aeg(Ac)-OH (40)**<sup>1</sup>H-NMR-Spektrum (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum (APT, 125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)



## B Übersicht der verwendeten Verbindungen

Nr.	Sequenz
Verbindungen aus Kapitel 4.4.1 (Sequenzinterne Fluoreszenzmarkierung)	
34	H-DD-K(FAM)- <i>gttg</i> -PQpYEEIPI- <i>caac</i> -K(Dabcyl)-G-NH <sub>2</sub>
35	H-DD- <i>gttg</i> -K(FAM)-PQpYEEIPI-K(Dabcyl)- <i>caac</i> -G-NH <sub>2</sub>
36	H-K(FAM)-PQpYEEIPI-K(Dabcyl)-G-NH <sub>2</sub>
Verbindungen aus Kapitel 4.4.4 (Detektion von SH2-Proteindomänen mit <i>IS-HPBs</i> )	
46	H- <i>g-P2-S-g</i> -PQpYEEIPI- <i>c-Q-S-c</i> -G-NH <sub>2</sub>
47	H- <i>g-P2-g</i> -PQpYEEIPI- <i>c-Q-c</i> -G-NH <sub>2</sub>
48	H- <i>t-P2-g</i> -PQpYEEIPI- <i>c-Q-a</i> -G-NH <sub>2</sub>
49	H- <i>t-P2-t</i> -PQpYEEIPI- <i>a-Q-a</i> -G-NH <sub>2</sub>
50	H- <i>g-P4-g</i> -PQpYEEIPI- <i>c-Q-c</i> -G-NH <sub>2</sub>
51	H- <i>t-P4-g</i> -PQpYEEIPI- <i>c-Q-a</i> -G-NH <sub>2</sub>
52	H- <i>t-P4-t</i> -PQpYEEIPI- <i>a-Q-a</i> -G-NH <sub>2</sub>
53	H- <i>gg-P2-g</i> -PQpYEEIPI- <i>c-Q-cc</i> -G-NH <sub>2</sub>
54	H- <i>g-P2-gg</i> -PQpYEEIPI- <i>cc-Q-c</i> -G-NH <sub>2</sub>
55	H- <i>g-P4-gg</i> -PQpYEEIPI- <i>cc-Q-c</i> -G-NH <sub>2</sub>
56	H- <i>ga-P2-ag</i> -PQpYEEIPI- <i>ct-Q-tc</i> -G-NH <sub>2</sub>
57	H- <i>ga-P4-ag</i> -PQpYEEIPI- <i>ct-Q-tc</i> -G-NH <sub>2</sub>
58	H- <i>gg-P2-gg</i> -PQpYEEIPI- <i>cc-Q-cc</i> -G-NH <sub>2</sub>
59	H- <i>cc-P2-cc</i> -PQpYEEIPI- <i>gg-Q-gg</i> -G-NH <sub>2</sub>
60	H- <i>tg-P2-gg</i> -PQpYEEIPI- <i>cc-Q-ca</i> -G-NH <sub>2</sub>
61	H- <i>tg-P4-gg</i> -PQpYEEIPI- <i>cc-Q-ca</i> -G-NH <sub>2</sub>
62	H- <i>cca-P2-ac</i> -PQpYEEIPI- <i>gt-Q-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
63	H- <i>cca-S-P2-S-ac</i> -PQpYEEIPI- <i>gt-Q-S-Q-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
64	H- <i>cca-P4-ac</i> -PQpYEEIPI- <i>gt-Q-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
65	H- <i>acc-P4-ca</i> -PQpYEEIPI- <i>tg-Q-ggt</i> -G-NH <sub>2</sub>
66	H- <i>cca-P2-S-P2-ac</i> -PQpYEEIPI- <i>gt-S-Q-S-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
67	H- <i>cca-P2-P2-ac</i> -PQpYEEIPI- <i>gt-Q-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
68	H- <i>ca-P2-P2-acc</i> -PQpYEEIPI- <i>ggt-Q-tg</i> -G-NH <sub>2</sub>
69	H-K(C2Pyr)-PQpYEEIPI-K(C1Anthr)-NH <sub>2</sub>
83	H- <i>acc-P4-ca</i> -PQpYEEIPI- <i>tg-S-ggt</i> -G-NH <sub>2</sub>
Fortsetzung nächste Seite	

## B Übersicht der verwendeten Verbindungen

Nr.	Sequenz
Verbindungen aus Kapitel 4.4.5 (Detektion von MMP-7 mit <i>IS-HPBs</i> )	
70	H- <i>cca-P2-S-P2-ac</i> -RPLALWRS- <i>gt-S-Q-S-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
71	H- <i>cca-P2-S-P2-ac</i> -Ahex-RPLALWRS-Ahex- <i>gt-S-Q-S-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
72	H- <i>cca-P2-S-P2-ac</i> -ßA-RPLALWRS-ßA- <i>gt-S-Q-S-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
73	H-DDD- <i>cca-P2-S-P2-ac</i> -RPLALWRS- <i>gt-S-Q-S-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
74	H-DDD- <i>cca-P2-S-P2-ac</i> -Ahex-RPLALWRS-Ahex- <i>gt-S-Q-S-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
75	H-DDD- <i>cca-P2-S-P2-ac</i> -ßA-RPLALWRS-ßA- <i>gt-S-Q-S-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
76	H- <i>cca-P2-P2-ac</i> -RPLALWRS- <i>gt-Q-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
77	H- <i>cca-P2-P2-ac</i> -Ahex-RPLALWRS-Ahex- <i>gt-Q-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
78	H- <i>cca-P2-P2-ac</i> -ßA-RPLALWRS-ßA- <i>gt-Q-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
79	H-DDD- <i>cca-P2-P2-ac</i> -RPLALWRS- <i>gt-Q-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
80	H-DDD- <i>cca-P2-P2-ac</i> -Ahex-RPLALWRS-Ahex- <i>gt-Q-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
81	H-DDD- <i>cca-P2-P2-ac</i> -ßA-RPLALWRS-ßA- <i>gt-Q-tgg</i> -G-NH <sub>2</sub>
82	H-K(C2Pyr)-K(C2Pyr)-RPLALWRS-K(C1Anthr)-NH <sub>2</sub>
Verbindungen aus Kapitel 4.5 (Thermodynamische Untersuchung der PNA-Peptid-Konjugate)	
13	H-K- <i>tttg</i> -PQpYEEIPI- <i>caaa</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
14	H-K- <i>gttg</i> -PQpYEEIPI- <i>caac</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
15	H-D-K- <i>gttg</i> -PQpYEEIPI- <i>caac</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
16	H-DD-K- <i>gttg</i> -PQpYEEIPI- <i>caac</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
17	H-DDD-K- <i>gttg</i> -PQpYEEIPI- <i>caac</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
18	H-DD-K- <i>tttg</i> -PQpYEEIPI- <i>caaa</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
19	H-DDD-K- <i>tttg</i> -PQpYEEIPI- <i>caaa</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
20	H-K- <i>gcta</i> -PQpYEEIPI- <i>ccaa</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
21	H-DD-K- <i>gcta</i> -PQpYEEIPI- <i>ccaa</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
22	H-DDD-K- <i>gcta</i> -PQpYEEIPI- <i>ccaa</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
23	H-DD-K- <i>gttg</i> -TEGQpYQPQP- <i>caac</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
24	H-DD-K- <i>tttg</i> -TEGQpYQPQP- <i>caaa</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
25	H-DD-K- <i>gcta</i> -TEGQpYQPQP- <i>ccaa</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
26	H-DD-K- <i>gttg</i> -PQpYEEIPI-K-G-NH <sub>2</sub>
27	H-DD-K- <i>tttg</i> -PQpYEEIPI-K-G-NH <sub>2</sub>
28	H-DD-K- <i>gcta</i> -PQpYEEIPI-K-G-NH <sub>2</sub>
29	H-DD-K-PQpYEEIPI- <i>caac</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
30	H-DD-K-PQpYEEIPI- <i>caaa</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
31	H-DD-K-PQpYEEIPI- <i>ccaa</i> -K-G-NH <sub>2</sub>
32	Ac-PQpYEEIPI-NH <sub>2</sub>
33	Ac-TEGQpYQPQP-NH <sub>2</sub>



## C Abkürzungsverzeichnis

Es wurde der Einbuchstabencode für Aminosäuren (L-Konfiguration: groß, D-Konfiguration: klein) verwendet. PNA-Monomere wurden mit kleinen, kursiv gedruckten Buchstaben (a, g, c, t) gekennzeichnet. Die mit den Chromophoren Pyren (**P2** mit 1-Pyrenessigsäure, **P4** mit 1-Pyrenbuttersäure) und Anthrachinon (**Q** mit Anthrachinon-2-carbonsäure) modifizierten PNA-Bausteine und das synthetisierte PNA-Monomer Fmoc-Aeg(Ac)-OH (**S**, **40**) wurden mit fett gedruckten Großbuchstaben dargestellt und unterstrichen, um eine Verwechslung mit den Aminosäuren in der Sequenz zu vermeiden.

Aeg	<i>N</i> -(2-Aminoethyl)glycin
Ahex	Aminohexansäure
Alloc	Allyloxycarbonyl
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Äq.	Äquivalent(e)
AS	Aminosäure
a.u.	<i>arbitrary unit</i>
AU	<i>absorbance units</i>
AuNP	Goldnanopartikel
b	PNA-Monomer
B	Nukleobase
BADAN	6-Bromoacetyl-2-dimethylaminonaphthalen
BEH	<i>Ethylene Bridged Hybrid</i>
ber.	berechnet
BHQ	<i>Black Hole Quencher</i>
Bhoc	Benzhydryloxycarbonyl
BIR	<i>Baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
C1Anthr	Anthrachinon-2-carbonsäure
C2Pyr	1-Pyrenessigsäure
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propansulfonat

CIP	alkalische Phosphatase, engl. <i>calf intestine phosphatase</i>
Dabcyl-OH	4-(4-Dimethylaminophenyl)diazenylbenzoesäure
Dansyl-OH	5-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonsäure
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM*	DMEM mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOPA	3,4-Dihydroxyphenylalanin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>N,N,N',N'</i> -Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	Elektrosprayionisation
<i>et al.</i>	und andere
FAM	5(6)-Carboxyfluorescein
FCS	fötales Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
gef.	gefunden
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HCTU	<i>O</i> -(6-Chlorbenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
hmT	<i>hamster polyomavirus middle-sized tumor</i>
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
<i>HPB</i>	<i>Hairpin Peptide Beacon</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRF	<i>instrument response function</i>

---

<i>IS-HPB</i>	<i>In-Stem Hairpin Peptide Beacon</i>
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
LB	<i>lysogeny broth</i>
Lck	<i>lymphocyte specific</i>
LTQ-FT-ICR	lineare Ionenfalle-Fouriertransformation-Ionenzyklotron-resonanz
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption und -ionisation
<i>MB</i>	<i>Molecular Beacon</i>
MBHA	4-Methylbenzhydrylamin
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
MMP	Matrix-Metalloprotease
Mmt	Monomethoxytrityl
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	molekulare Masse
n.b.	nicht bestimmbar
NCL	native chemische Ligation
NIR	nahes Infrarot
NMA	<i>N</i> -Methylanilin
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMP	<i>N</i> -Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz, engl. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	Pefabloc <sup>®</sup> SC
PDB-ID	<i>Protein Data Bank identification code</i>
PET	photoinduzierter Elektronentransfer
PNA	Peptidnukleinsäure
PNA I	<i>N</i> -terminales PNA-Segment der PNA-Peptid-Konjugate
PNA II	<i>C</i> -terminales PNA-Segment der PNA-Peptid-Konjugate
pY	Phosphotyrosin
PyBOP	(Benzotriazol-1-yl)oxytripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
Pyr	Pyren

QD	Quantum Dot
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
Src	Akronym aus <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i>
TB	<i>terrific broth</i>
TCSPC	<i>Time-Correlated Single Photon Counting</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIS	Triisopropylsilan
TMR	Carboxytetramethylrhodamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Trt	Trityl
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbar (engl. <i>visible</i> )
X	<i>N</i> -terminale Modifikation der PNA-Peptid-Konjugate
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis proteins
Z	Benzyloxycarbonyl

# Danksagung

In erster Linie gilt mein Dank Prof. Dr. Oliver Seitz, der mir die Möglichkeit gab innerhalb seines Arbeitskreises das interessante Forschungsthema zu bearbeiten und mich stets mit kritischen Diskussionen und Anregungen in meiner Arbeit begleitet hat.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Nadin Jahnke (FMP) und Dr. Horst Hennig (AK Ernsting, HU-Berlin, i. R.) für die Einführung in die ITC-Methode und die Betreuung bei der Durchführung der Experimente. Des Weiteren möchte ich Dr. Daniel Geißler und Dr. Ute Resch-Genger von der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung danken, die mich in den zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen unterstützten und mir die Verwendung ihres Gerätes gestatteten.

Meinen Erstkorrektoren, Dr. Franziska Diezmann, Robert Zitterbart, Dr. Dominic Gröger und Katharina Gröger, danke ich für ihre Sichtweise auf mein Thema und ihre konstruktiven Anregungen.

Ohne die Hilfe von Dr. Anne Adams wäre eine Expression der Proteindomänen nicht möglich gewesen. Sie wies mich in die mikrobiologischen Methoden ein und gab mir Hinweise und Ratschläge für eine erfolgreiche Umsetzung - vielen Dank dafür. Des Weiteren möchte ich dem Arbeitskreis Prof. Arenz für die Nutzung ihres Genlabors der Sicherheitsstufe 1 danken. Im Besonderen gilt mein Dank Susanne Redmer, die immer für Ordnung und Sauberkeit im Genlabor sorgte.

Ich möchte meinen Laborkollegen, Dr. Hendrik Eberhard, Dr. Alexander Roloff, Dr. Franziska Diezmann und Ziv Harpaz, für die gute Arbeitsatmosphäre danken. Durch die Musik und die Gespräche verging die Laborzeit wie im Flug.

Dem gesamten Arbeitskreis Seitz gilt mein Dank für die gemeinsamen Aktivitäten nach der Arbeit und die Gruppenausflüge, bei denen sich Freundschaften bildeten, die hoffentlich ein Leben lang andauern werden. Im Besonderen möchte ich mich bei der Mittagsrunde bedanken, die stets für eine Ablenkung sorgte und einem neue Energie für die zweite Tageshälfte gab. Den „Mädels“, Dr. Julia Michaelis, Michaela Marczyne und Henrik Petszulat, danke ich für die regelmäßige, kulturelle Unterhaltung, bei der man die Seele baumeln lassen konnte.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinem Freund Matthias Scheffler, der auf seine ganz eigene Art immer für Motivation sorgte und mir gezeigt hat, was wirklich wichtig ist im Leben.



# Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Melanie Fischbach, die vorliegende Dissertation selbstständig erarbeitet und verfasst zu haben. Es wurden keine weiteren Quellen oder Hilfsmittel als die hier angegeben verwendet.

---

Datum, Unterschrift